

N° D'ORDRE : 2594

N° DE SÉRIE 1728

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Relda CAILLEAU

LABORATOIRE DE PROTISTOLOGIE DE L'INSTITUT PASTEUR

1^{re} THÈSE. — LA NUTRITION DES FLAGELLÉS TÉTRAMITIDÉS. LES STÉROLS,
FACTEURS DE CROISSANCE POUR LES TRICHOMONADES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le juin 1937 devant la Commission d'Examen.

30 JUIN 1937

MM. CAULLERY . . .	<i>Président.</i>
M. JAVILLIER . .	<i>Rapporteur.</i>
ROBERT-LÉVY . .	<i>Examinateur.</i>

PARIS

IMPRIMERIE A. MARETHEUX ET L. PACTAT

1, RUE CASSETTE, 1

1937

N° D'ORDRE : 2594

N° DE SÉRIE 1728

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Relda CAILLEAU

LABORATOIRE DE PROTISTOLOGIE DE L'INSTITUT PASTEUR

1^{re} THÈSE. — LA NUTRITION DES FLAGELLÉS TÉTRAMITIDÉS. LES STÉROLS,
FACTEURS DE CROISSANCE POUR LES TRICHOMONADES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le **juin 1937** devant la Commission d'Examen.

MM. CAULLERY . . .	<i>Président.</i>
M. JAVILLIER . .	<i>Rapporteur.</i>
ROBERT-LÉVY . .	<i>Examinateur.</i>

PARIS

IMPRIMERIE A. MARETHEUX ET L. PACTAT

1, RUE CASSETTE, 1

1937

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire. . . . M. MOLLIARD.

Doyen. C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du Globe.

Professeurs honoraires.	H. LEBESGUE.	FREUNDLER.	VESSIOT.
	A. FERNBACH.	AUGER.	PORTIER.
	Émile PICARD.	BLAISE.	MOLLIARD.
	LÉON BRILLOUIN.	DANGEARD	LAPICQUE.
	GUILLET.	LESPIEAU.	
	PÉCHARD.	MARCHIS.	

PROFESSEURS

G. BERTRAND.	T	Chimie biologique.	F. PICARD.	Zoologie (Évolution des êtres organisés).
M. CAULLERY.	T	Zoologie (Évolution des êtres organisés).	Henri VILLAT.	T Mécanique des fluides et applications.
G. URBAIN.	T	Chimie générale.	Ch. JACOB.	T Géologie.
Émile BOREL.	T	Calcul des probabilités et Physique mathém.	P. PASCAL.	T Chimie minérale.
Jean PERRIN.	T	Chimie physique.	M. FRÉCHET.	T Calcul différentiel et Calcul intégral.
H. ABRAHAM.	T	Physique.	E. ESCLANGON.	T Astronomie.
E. CARTAN.	T	Géométrie supérieure.	M ^{me} RAMART-LUCAS.	T Chimie organique.
A. COTTON.	T	Recherches physiques.	H. BÉCHIN.	T Mécanique physique et expérimentale.
J. DRACH.	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	FOCH.	Mécanique expérimentale des fluides.
Charles FABRY.	T	Enseignement de Physique.	PAUTHENIER.	Physique (P. C. B.).
Charles PÉREZ.	T	Zoologie.	De BROGLIE.	T Théories physiques.
Léon BERTRAND.	T	Géologie structurale et géologie appliquée.	CHRÉTIEN.	Optique appliquée.
E. RABAUD.	T	Biologie expérimentale.	P. JOB.	Chimie générale.
M. GUICHARD.		Chimie minérale.	LABROUSTE.	Physique du Globe.
Paul MONTEL.	T	Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	PRENANT.	Zoologie.
P. WINTREBERT.	T	Anatomie et histologie comparées.	VILLEY.	Mécanique physique et expérimentale.
L. BLARINGHEM.	T	Botanique.	BOHN.	Zoologie (P. C. B.).
O. DUBOSCQ.	T	Biologie maritime.	COMBES.	T Physiologie végétale.
G. JULIA.	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.	GARNIER.	T Mathématiques générales.
C. MAUGUIN.	T	Minéralogie.	PÈRES.	Mécanique théorique des fluides.
A. MICHEL-LÉVY.	T	Pétrographie.	HACKSPILL.	Chimie (P. C. B.).
H. BÉNARD.	T	Mécanique expérimentale des fluides.	LAUGIER.	T Physiologie générale.
A. DENJOY.	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	TOUSSAINT.	Technique Aéronautique.
L. LUTAUD.	T	Géographie physique et géologie dynamique.	M. CURIE.	Physique (P. C. B.).
Eugène BLOCH.	T	Physique théorique et physique céleste.	G. RIBAUD.	T Hautes températures.
G. BRUHAT.		Physique.	CHAZY.	T Mécanique rationnelle.
E. DARMOIS.		Enseignement de Physique.	GAULT.	Chimie (P. C. B.).
A. DEBIERNE.	T	Physique générale et Radioactivité.	CROZE.	Recherches Physiques.
A. DUFOUR.	T	Physique (P. C. B.).	DUPONT.	T Théories chimiques.
L. DUNOYER.		Optique appliquée.	LANQUINE.	Géologie.
A. GUILLIERMOND.	T	Botanique.	VALIRON.	Mathématiques générales.
M. JAVILLIER.		Chimie biologique.	BARRABÉ.	Géologie structurale et géologie appliquée.
L. JOLEAUD.		Paléontologie.	MILLOT.	Zoologie (P. C. B.).
ROBERT-LÉVY.	T	Physiologie comparée.	F. PERRIN.	Théories physiques.
			VAVON.	Chimie organique.
			G. DARMOIS.	Calcul des probabilités et Physique-Mathématique.

Secrétaire. A. PACAUD.

Secrétaire honoraire. D. TOMBECK.



Relda CAILLEAU

Laboratoire de Protistologie
de l'Institut Pasteur.

LA NUTRITION DES FLAGELLÉS TÉTRAMITIDÉS.
LES STÉROLS, FACTEURS DE CROISSANCE
POUR LES TRICHOMONADES *

SOMMAIRE

	Pages
I. Introduction	7
II. <i>Eutrichomastix colubrorum</i>	11
A. Introduction	11
1. Historique	11
2. Matériel	13
3. Technique	13
4. Bols fécaux	13
B. Etude du développement d' <i>E. colubrorum</i> dans divers milieux	14
1. Essais de détermination de la fraction active du sang	15
C. Etude du développement en présence du sérum de divers animaux	16
1. Conditions de l'expérimentation	16
2. Sérums utilisés	17
D. Fermentation des glucides et polyalcools	20
E. Etude des modifications du milieu de culture	20

* A l'impression aux *Annales de l'Institut Pasteur*, 1937, t. 59.

III. <i>Trichomonas foetus</i>	22
A. Introduction	22
1. Historique	22
2. Culture	22
3. Matériel	25
4. Milieu d'entretien	25
B. Etude du comportement des différentes souches de <i>T. foetus</i>	26
1. Température	26
2. Milieux	26
C. Fermentation des glucides et polyalcools	27
D. Métabolisme azoté de <i>T. foetus</i>	27
E. Réactions en présence du sérum de divers animaux	28
1. Souche Riedmüller	28
2. Souche Glaser	31
F. Essai de détermination de la cause d'absence d'action des sérums	32
IV. <i>Trichomonas columbæ</i>	34
A. Introduction et historique	34
B. Matériel et recherches préliminaires	35
1. Milieux contenant un substratum solide	35
2. Milieux liquides	36
3. Milieux au foie	37
4. Influence du pH	38
5. Influence de la température	38
C. Etude de différents tissus et organes	39
D. Fermentation des glucides et polyalcools	39
E. Culture de <i>Trichomonas columbæ</i> en présence de divers sérums	41
F. Analyse de l'absence d'action du sérum de cheval	41
V. Les stérols, facteurs de croissance pour <i>Trichomonas columbæ</i>	44
A. Recherches préliminaires	44
1. Fractionnement du foie de veau	44
2. Etude de diverses substances	46
B. Etude du cholestérol	47
C. Etude de l'activité de divers stérols	48
D. Remarques sur l'activité de quelques stérols	63
E. Les conditions d'action des stérols	64

VI. Remarques sur la physiologie des Tétramitidés	65
A. Comparaison des tétramitidés étudiés	65
1. Utilisation de divers sérums	65
2. Fermentation des glucides.	66
3. Température.	66
B. Facteurs de croissance et spécificité parasitaire	67
C. Le cholestérol considéré comme facteur de croissance	68
D. Les stérols chez les Bactéries.	69
E. Les stérols, facteurs de croissance pour les Insectes.	70
F. Rôle physiologique des stérols	71
VII. Résumé et conclusions	74
VIII. Travaux cités	78

INTRODUCTION

Les Protozoaires au sens de A. Lwoff, c'est-à-dire excluant les chlorophytes et les leucophytes, doivent être classés, au point de vue des modalités de leur nutrition, en phagotrophes et osmotrophes (A. Lwoff 1932). Le fait que la grande majorité des Protozoaires libres sont phagotrophes stricts (ne peuvent se nourrir que de substances figurées, de particules) a longtemps retardé l'étude biochimique de leur nutrition. Cependant, un certain nombre d'organismes normalement phagotrophes peuvent utiliser les substances dissoutes. C'est le cas du cilié *Glaucoma piriiformis*. Cette particularité a permis d'étudier le pouvoir de synthèse de ces infusoires et de définir ainsi un type « métatrophe » (Lwoff 1932) : organismes capables de se multiplier dans les solutions de « peptones » résultant de l'hydrolyse pepsique et trypsique ménagée des protides.

Nous avons pu montrer (Cailleau 1933 *a, b*, 1934) qu'une amibe, *Acanthamoeba castellanii*, normalement phagotrophe, était elle aussi capable de se nourrir de substances dissoutes et présentait des besoins semblables à ceux de *Glaucoma piriiformis*.

Enfin, dans une série de travaux, Hetherington (1933), Elliott (1933) et Hall et Elliott (1933) ont confirmé les conclusions de Lwoff relatives à *Glaucoma piriiformis* et les ont étendues à d'autres espèces de *Glaucoma*.

D'autre part, Reich (1934) est arrivé, pour une amibe, *Mayorella palestinensis*, à des résultats identiques aux nôtres relativement à la possibilité, pour certaines amibes, d'utiliser les substances dissoutes (eau peptonée).

On peut donc considérer le type métatrophe de A. Lwoff

comme le type physiologique moyen des Protozoaires libres. Et l'on est alors en situation de définir biologiquement le parasitisme des Protozoaires, c'est-à-dire de voir en quoi le pouvoir de synthèse des Protozoaires parasites diffère du pouvoir de synthèse des Protozoaires libres appartenant au type métatrophe.

Les seules recherches effectuées jusqu'ici dans cet ordre d'idée sont celles de Marguerite Lwoff (1933) qui a analysé systématiquement le pouvoir de synthèse d'un certain nombre de Trypanosomides et a montré que certains d'entre eux se comportent comme les métatrophes, alors que d'autres sont incapables de réaliser la synthèse de la protohémine et que la protohémine est nécessaire à leur multiplication. C'était la première fois qu'on déterminait la nature d'un facteur de croissance indispensable à un Protozoaire.

*
* *

Nous nous sommes proposé dans ce travail de définir, par rapport au type métatrophe, le pouvoir de synthèse de quelques flagellés parasites appartenant aux genres *Trichomonas* et *Eutrichomastix*. En d'autres termes, de déterminer la nature des facteurs de croissance nécessaires pour leur multiplication.

Les *Trichomonas* sont des flagellés appartenant à l'ordre des Polymastigines et à la famille des *Tetramitidae*. Primitivement et généralement parasites du tube digestif des vertébrés et des invertébrés, certains d'entre eux peuvent cependant passer dans le système circulatoire de leur hôte. D'autres ont quitté le tube digestif pour aller coloniser des organes divers : foie, muscle, poumon, etc... : *Trichomonas columbæ*; organes génitaux : *Trichomonas foetus*.

On connaît cependant chez les Tétramitidés des formes libres appartenant au genre *Tetramitus* et peut-être *Trichomonas* (Ann Bishop, 1935-1936).

La première culture pure d'un Tétramitidé (*Eutrichomastix colubrorum*) a été obtenue par Chatton, en 1918. Par la suite,

Witte (1933) obtint la culture pure de *Trichomonas foetus*, puis Bos (1933) réalisa celle de *Trichomonas columbae*. Ce sont ces trois flagellés que nous avons étudiés.

Nous avons pu préciser les conditions de leur multiplication *in vitro* et, pour *Tr. columbae*, déterminer la nature chimique de l'un des facteurs de croissance : le cholestérol. L'activité, en tant que facteur de croissance, de plus de 60 stérols, a pu être étudiée, ce qui nous a permis d'établir les lois de l'activité de ces composés.

*
* *

Ce travail a été effectué au laboratoire de Protistologie de l'Institut Pasteur; c'est pour nous un agréable devoir de témoigner notre profonde reconnaissance au Professeur F. Mesnil, qui, depuis 1932, nous a accordé dans son service la plus large hospitalité.

Nous tenons à remercier aussi le Professeur M. Schoen qui nous a souvent admise dans son laboratoire où nous avons pu poursuivre une partie de nos recherches chimiques.

Ce travail a été exécuté sous la direction particulière de M. André Lwoff qui nous a constamment fait profiter de son expérience et nous a conseillé pour notre rédaction ; nous lui exprimons notre très vive gratitude.

Nous sommes reconnaissante à M^{me} Marguerite Lwoff de la peine qu'elle a prise à la mise au point de notre manuscrit et à la révision de nos épreuves.

Le Professeur E. Chatton, le D^r J. Witte, le D^r A. Bos, le D^r Glaser et le D^r Riedmüller ont généreusement mis leurs souches de flagellés à notre disposition; qu'ils veuillent trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.

Nous avons été aidée, au début de nos recherches sur les stérols, par le D^r A. Girard qui a bien voulu préparer et purifier pour nous divers stérols. Par la suite, nous avons eu la bonne fortune d'entrer en relation avec le Professeur Otto Rosenheim qui nous a donné de nombreux et précieux échantillons de stérols et qui a bien voulu suivre, conseiller et encourager la longue série de nos recherches. Nous sommes

également redevables de quelques échantillons de stérols aux Professeurs Windaus, Schœnheimier, Stoll et Bengtsson. Nous leur sommes particulièrement reconnaissante pour leur collaboration sans laquelle ce travail n'aurait pu être mené à bien. Nous tenons aussi à remercier les « Glaxo Laboratories » qui ont généreusement mis quelques échantillons de stérols à notre disposition.

Nous sommes heureuse de trouver ici l'occasion d'exprimer notre respectueuse gratitude au D^r Louis Martin, Directeur de l'Institut Pasteur, qui nous a, à plusieurs reprises, témoigné sa bienveillance et aidée à la réalisation de ce travail.

EUTRICHOMASTIX COLUBRORUM (Hammers 1844)

Introduction

HISTORIQUE. — *Eutrichomastix colubrorum* (Hammers 1844) est le premier flagellé parasite intestinal qui ait été obtenu en culture bactériologiquement pure. Cette culture a été réalisée en 1918, par E. Chatton, à l'Institut Pasteur de Tunis.

Chatton, en examinant le sang de plus de 1.000 Geckos (*Tarentola mauritanica*), constata la présence d'*Eutrichomastix* chez quelques-uns d'entre eux, 1 fois par l'examen d'un frottis, et 3 fois sur 136 dans des cultures faites à partir du sang ou des organes. L'une de ces cultures fournit une souche pure d'*Eutrichomastix colubrorum*.

Cet isolement avait été fait sur milieu N. N. N. (gélose + bouillon peptoné au sang), mais ce milieu fut trouvé défavorable au cours des repiquages suivants. Par contre, des repiquages furent pratiqués avec succès dans un milieu constitué par du bouillon ou de l'eau physiologique additionnés d'un fragment de foie de lapin prélevé aseptiquement. Par la suite, Chatton établit que le bouillon peptoné additionné de 5 à 10 p. 100 de sang total de lapin constituait le milieu le plus favorable. Chatton montra aussi qu'*Eutrichomastix colubrorum* était incapable de se multiplier dans le bouillon peptoné ordinaire, non plus que sur gélose ascite, ni en liquide d'ascite, et qu'un fragment d'organe était nécessaire. Il remarqua aussi qu'*Eutrichomastix* se développe mieux en semi-anaérobiose : bouillon-sang recouvert d'une couche d'huile de

vaseline ou de paraffine et que les meilleures cultures étaient obtenues en milieu légèrement acide (teinte rose violet au tournesol). Chatton a montré également que ni la partie liquide du milieu bouillon + organe, ni le bouillon additionné de sérum de lapin, ne permettaient la culture.

D'autre part, il constata que, dans l'eau physiologique neutre ou acidulée à l'acide lactique, additionnée de sang de lapin, les *Eutrichomastix* ne se développent pas, alors qu'ils se multiplient bien dans des tubes d'eau physiologique, de



FIG. 1. — *Eutrichomastix colubrorum* demi-schématique ($\times 2500$).

même réaction, contenant des fragments d'organes ou dans des tubes de bouillon de viande non peptonée additionnés de sang de lapin. Il conclut à l'existence, à la fois dans les parenchymes d'organes et dans le bouillon de viande, alors qu'elle fait défaut dans le sang, d'une substance dissoute, thermostable, assimilable par *Eutrichomastix colubrorum*, et nécessaire à sa végétation.

Enfin, Chatton démontra aussi que la culture se développe en six à huit jours à $18-22^{\circ}$ et en deux à trois jours à 37° . Il termina en indiquant que le milieu au foie ou à la rate (coagulés dans l'eau physiologique à 120°) a permis le dévelop-

pement des cultures qui ont subi 7 repiquages en quatre mois environ.

MATÉRIEL. — *Souche.* — Toutes nos expériences sur *Eutr. colubrorum* ont été effectuées avec la souche isolée par Chatton (1918) et entretenue depuis, au laboratoire de Protistologie d'une part, et, à la Station biologique de Sète par Chatton, d'autre part, par repiquage toutes les trois semaines dans le milieu de Chatton (bouillon acide pH 6,0 + sang, sous huile de vaseline). Cette souche est toujours bactériologiquement pure.

TECHNIQUE. — Les expériences sont faites soit dans des tubes à essai de 16 millimètres de diamètre environ, renfermant de 8 à 9 cent. cubes de milieu, soit dans des tubes à essai de 10 millimètres de diamètre intérieur, renfermant 3 cent. cubes de liquide ; ceux-ci ont été plus particulièrement utilisés pour l'étude de l'action des divers sérums.

L'ensemencement des grands tubes est effectué à la pipette avec VI gouttes d'une culture riche (renfermant plus de 1.500 flagellés par millimètre cube) et celui des petits tubes avec III gouttes. Si la culture est pauvre (culture très jeune ou très âgée), l'ensemencement doit être plus abondant. Il va sans dire que nous ne tenons pas compte des résultats des premiers repiquages qui peuvent être faussés par l'apport du milieu primitif avec le flagellé ensemencé. Avant d'affirmer qu'un milieu est favorable, nous faisons au moins 4 expériences en série dans ce milieu.

BOLS FÉCAUX. — On peut voir apparaître, dans la culture d'*Eutr. colubrorum* en bouillon sang, des petites sphérules réfringentes. Dans les cultures anciennes en particulier, ces sphérules forment de gros amas le long des parois ou au fond des tubes. Leur présence n'a pas encore été décrite. Elles ont été observées par E. Chatton au cours de ses expériences avec le bouillon sang, et par A. Lwoff au cours de l'entretien de la souche (communications orales). Ces sphérules que l'on pourrait à première vue prendre pour des bac-

téries représentent très probablement des excréta des *Eutrichomastix*. Nous les appelons « bols fécaux ».

Tous les essais de culture de ces éléments sur milieux solides ou liquides en aérobiose et en anaérobiose, ont toujours été négatifs.

Ces « bols fécaux » sont particulièrement abondants dans les milieux à base de sérum, notamment dans le bouillon additionné de sérum de cheval, de sérum humain et de sérum de rat.

Etude du développement d'« *Eutrichomastix colubrorum* » dans divers milieux.

Nous avons essayé d'obtenir le développement d'*Eutr. colubrorum* dans les milieux que nous utilisons pour les cultures de *Trichomonas foetus* et *Trichomonas columbae* (voir p. 35).

1° *Milieu à l'œuf coagulé.* — Milieu L. E. B. de Kofoid et Wagener.

4 œufs sont ajoutés à 50 cent. cubes de liquide de Locke, on agite jusqu'à obtention d'un milieu homogène, on répartit en tubes inclinés, et on coagule à 80° C. On ajoute ensuite du liquide de Ringer ou de Locke (stérile) + 5 p. 100 de sang de lapin ou de sérum de cheval. Ce milieu « Locke, œuf, sang » a été utilisé par Bos pour la culture de *Tr. columbae* et un milieu semblable a été employé par Witte pour ses premières cultures de *Tr. foetus*.

Dans ce milieu, il y a formation d'une culture abondante d'*Eutrichomastix colubrorum* à 28° ; les flagellés restent vivants trente jours environ. Les repiquages en série sont possibles; nous avons fait 15 repiquages en six mois.

2° *Sérum de cheval coagulé*, recouvert avec du bouillon peptoné additionné de 5 p. 100 de sérum de cheval.

Ce milieu permet, à 28°, le développement en deux ou trois jours de cultures riches en *Eutr. colubrorum*. Les flagellés, cependant, survivent rarement plus de douze jours.

Dans ce milieu, il y a formation très abondante de « bols fécaux ».

3° *Bouillon + foie de veau*. — Dans ce milieu, nous n'avons jamais pu obtenir plus de 4 repiquages en série d'*Eutr. colubrorum*. Ces expériences ont été répétées plusieurs fois avec les mêmes résultats. D'autre part, le foie de veau a été remplacé par du foie et de l'intestin de lapin et du foie de pigeon. Ces essais ont été également négatifs.

Ces résultats sont en désaccord avec ceux obtenus par Chatton dans ses premières expériences. Nous ne nous expliquons pas cette divergence. Remarquons seulement que Chatton a travaillé avec une souche récemment isolée et que nous avons expérimenté avec la même souche entretenue en bouillon-sang depuis dix-sept ans (270 repiquages environ).

ESSAIS DE DÉTERMINATION DE LA FRACTION ACTIVE DU SANG.

Nos premiers essais pour remplacer le sang total par du sérum ont donné des résultats négatifs. Le bouillon, l'eau peptonée à 3 p. 100 (peptone Chapoteaut), additionnés de 5 p. 100 de sérum de lapin, n'ont pas permis la culture.

Nous avons alors ajouté au bouillon, à raison de 5 p. 100, les liquides suivants :

1° Sang de lapin défibriné ;

2° Globules rouges lavés (3 centrifugations et suspensions en eau physiologique) ;

3° Sérum de lapin (inactivé une demi-heure à 56°).

Nos résultats ont été en accord avec ceux de Chatton. Le sang total permet des cultures abondantes. Les hématies lavées donnent des résultats irréguliers, développement abondant observé dans quelques cas seulement au premier et au deuxième repiquage. Repiquage ultérieur impossible. Enfin, le sérum de lapin, ainsi qu'il a été dit plus haut, donne des résultats négatifs. Mais il n'en est pas de même avec les sérums d'autres animaux qui, ajoutés au bouillon, se sont montrés capables d'assurer la multiplication d'*Eutrichomastix colubrorum*.

Etude du développement en présence du sérum de divers animaux.

Les résultats excellents obtenus dans le milieu au sérum coagulé + bouillon + sérum de cheval (voir p. 14) avaient attiré notre attention. Il semblait que le sérum de cheval agissait là où le sérum de lapin échouait. Nous avons constaté, par la suite, que le bouillon additionné de 5 p. 100 de sérum de cheval constituait un excellent milieu de culture et d'entretien pour *Eutr. colubrorum*.

Nous avons ensuite étendu nos essais à des sérums de 8 autres espèces animales. Mais avant de donner les résultats de ces expériences, nous voudrions indiquer en détail les conditions des recherches.

CONDITIONS D'EXPÉRIMENTATION.

Le sang était toujours prélevé aseptiquement par ponction du cœur chez le chat, le cobaye, le lapin, le pigeon, la poule, et le rat ; par ponction de la veine médiane du bras chez l'homme et à la veine jugulaire du cheval et du mouton. Après coagulation du sang, le sérum prélevé stérilement et réparti en tubes est chauffé dans un bain-marie à 56°, pendant une demi-heure, trois jours de suite. Cette précaution est nécessaire, tant pour inactiver le sérum, que pour donner une sécurité supplémentaire quant à la stérilité.

Dans toutes nos expériences, nous avons ajouté III gouttes de sérum dans 3 cent. cubes de bouillon, ce qui donne une concentration de 5 p. 100 environ.

Lorsque la quantité de sérum disponible s'est révélée insuffisante pour une expérience complète (10 repiquages) le fait a été noté (voir tableau n° I). Ceci est toujours le cas pour le sérum de rat ou de cobaye, où la quantité de sérum que peut fournir un individu est toujours réduite. Ce changement de sérum peut troubler la marche de l'expérience, car les sérums de certains individus, non seulement peuvent se montrer défavorables pour la culture des *Eutrichomastix*, mais sont parfois

capables d'empêcher la multiplication. Chaque fois que cela a été possible, deux séries semblables au moins ont été faites avec le sérum d'un même individu et, en tout cas, au moins deux individus différents de la même espèce ont été utilisés.

Les facteurs suivants ne semblent jouer aucun rôle important dans la variation des résultats :

A. L'âge du sérum (qui varie entre trois jours et trois mois).

B. La teneur du sérum en hémoglobine.

Par contre, d'autres facteurs jouent un rôle beaucoup plus important. Ce sont :

C. La quantité de cultureensemencée (en général III gouttes).

D. La densité, l'âge et l'état de la cultureensemencée.

E. Les propriétés individuelles du sérum employé.

L'importance du nombre de flagellésensemencés est apparue, au cours d'expériences préliminaires réalisées pour essayer de déterminer si une culture pouvait se produire dans un milieuensemencé avec un seul flagellé.

Ces expériences montrèrent qu'une série de milieux identiques,ensemencés avec I à III gouttes d'une culture permirent un développement, alors que les mêmes milieuxensemencés avec une anse restèrent stériles (présence de flagellés vivants constatée dans le liquideensemencé).

A fortiori restèrent stériles les tubesensemencés avec un seul flagellé prélevé avec une pipette capillaire.

Si la culture est vieille (un petit nombre de flagellés mobiles) ou si la culture est trop jeune et par conséquent pas encore abondante, unensemencement normal (III gouttes) peut être insuffisant.

Nous avons soigneusement évité ces deux causes d'erreur ; quant à la troisième, qui dépend des qualités individuelles d'un sérum, on ne peut guère l'atténuer qu'en multipliant les expériences.

SÉRUMS UTILISÉS DE DIVERS ANIMAUX.

Homme. — Le sérum d'un individu a permis deux séries, l'une de 10, l'autre de 7 repiquages. Le sérum d'un autre individu a donné des résultats négatifs.

Chat. — Les sérums de deux chats ont été étudiés, l'un d'eux a permis 13 repiquages en série, l'autre a donné des résultats négatifs.

Cheval. — Après les recherches préliminaires, les sérums de deux individus ont été étudiés en détail. Le sérum du premier cheval a permis deux séries de repiquage, l'une de 8 et l'autre de 12.

Le sérum du deuxième individu a donné 10 repiquages. Dans les 2 cas, ces séries ont été volontairement interrompues.

Lapin. — Le sérum de 3 individus a donné des résultats négatifs. Nous ne tenons naturellement pas compte du premier repiquage. Le sérum d'un quatrième lapin a permis seulement 4 repiquages en série.

Mouton. — Le sérum d'un mouton a permis 2 séries, l'une de 14 et l'autre de 10 repiquages. Le sérum d'un deuxième individu n'a permis que 3 repiquages.

Cobaye. — Nous avons obtenu : une fois 8 repiquages avec le sérum d'un seul cobaye, une autre fois, 11 repiquages (sérum de 2 animaux) et une troisième fois 13 repiquages (sérum de 3 animaux différents).

Rat. — Nous avons obtenu, avec le sérum de 3 rats, une série de 13 repiquages. Les autres essais avec le sérum de 3 autres rats ont été négatifs.

Pigeon. — Le sérum de pigeon a toujours donné des résultats négatifs (4 individus différents).

Poule. — 6 repiquages ont été obtenus avec le sérum d'une poule. Mais 2 autres essais, avec d'autres échantillons du même sérum, ont été négatifs, ainsi que le sérum d'une autre poule.

On voit donc que les sérums des diverses espèces animales se comportent de façons très différentes, si on les envisage comme source de facteur de croissance pour *Eutr. colubrorum*.

Le sérum de lapin et de pigeon donnent des résultats négatifs. Le sérum de chat, de poule, de rat et d'homme, des résultats très irréguliers. Les sérums de cobaye et de cheval sont favorables.

Il faut noter que, même avec un sérum ne permettant pas

l'entretien en série, le premier repiquage est positif. D'autre part, nous n'avons jamais observé d'agglutination comme celle présentée par *Tr. fetus* et *Tr. columbae* (voir p. 41).

Fermentation des divers glucides et polyalcools.

Nous nous sommes proposé d'étudier les fermentations des glucides et polyalcools produites par *Eutrichomastix colubrorum* (Cailleau 1936 a).

Le milieu employé était le bouillon ordinaire additionné d'un fragment d'intestin (bien lavé à l'eau physiologique, puis à l'eau distillée). Le tout est porté trente minutes à 120°. Le pH est mesuré avec l'électrode de quinhydrone. Le pH du milieu témoin, sans sucre, est de 6,6 environ, et ne subit pas de modification appréciable pendant le développement de la culture.

Nous disons que le sucre est fermenté lorsque le pH tombe au-dessous de 6,5. Par mesure de précaution, nous conservons toujours, comme second témoin, un tube de milieu additionné du sucre étudié et non ensemencé, dont nous mesurons le pH.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Forte acidification : le pH tombe de 6,5 à 5,4-5,6 : glucose, galactose, lévulose, maltose, saccharose et raffinose.

Légère acidification : le pH tombe de 6,5 à 6,2-6,4 : lactose.

Pas d'acidification : le pH ne descend pas au-dessous de 6,5 : arabinose, xylose, rhamnose, inuline, dextrine, glycérine, érythrite, sorbite, dulcité et mannose.

Etude des modifications du milieu de culture.

Nous avons essayé de déterminer les substances aux dépens desquelles les *Eutrichomastix* effectuent leur développement en bouillon + sérum de cheval à 10 p. 100.

Malgré la richesse des cultures (1500-7500 flagellés par millimètre cube), nous n'avons pu mettre en évidence des différences importantes, entre le milieu témoin et la culture, de

la teneur en azote précipitable par l'acide phosphotungstique, en azote aminé et en azote ammoniacal (cultures de cinq et de neuf jours).

Ceci est dû à la richesse en azote de nos milieux de culture et au faible développement des flagellés, considéré au point de vue pondéral.

Nous pouvons conclure cependant que *Eutrichomastix colubrorum* n'excrète pas de ferment protéolytique actif et qu'il ne produit qu'une quantité très faible d'ammoniaque.

Exemples ; azote ammoniacal : témoin 8,4, culture 11,2. — Témoin 9,8, culture 12,6 (exprimé en milligrammes pour 100 cent. cubes de milieu.)

TRICHOMONAS FŒTUS (Riedmüller 1928)

Introduction.

HISTORIQUE. — *Trichomonas fœtus* (Riedmüller 1928) = *Tr. genitalis* (Witte 1933) a été découvert en 1900 par Mazzanti, dans les sécrétions vaginales de la vache. En 1928, Riedmüller établit que ce flagellé était l'agent étiologique de la pyométrite abortive des bovidés. Ces travaux furent bientôt confirmés par Abelein, Kust, Witte, Daust, etc.

CULTURE. — La culture pure de *Trichomonas fœtus* a été obtenue en 1933 par J. Witte à partir du pus provenant d'une vache atteinte de pyométrite. La stérilité du pus au point de vue bactérien ayant été constatée, l'ensemencement direct en bouillon-sang donna une culture pure d'emblée. D'autre part, Witte étudia les 19 milieux suivants :

- 1° Gélose peptonée avec beaucoup d'eau de condensation ;
- 2° Même milieu avec quelques gouttes de sang dans l'eau de condensation ;
- 3° Sérum de cheval coagulé ;
- 4° Sérum de bœuf ;
- 5° Sérum (cheval ou bœuf) coagulé, avec quelques gouttes de sang dans l'eau de condensation ;
- 6° Milieu à l'œuf de Hohn (sans glycérine) avec addition de bouillon à l'eau de condensation ;
- 7° Même milieu avec quelques gouttes de sang ajoutées à l'eau de condensation ;
- 8° Milieu 6 avec quelques gouttes de sérum ajoutées à l'eau de condensation ;

- 9° Eau peptonée à 10 p. 100 (peptone de Witte) ;
- 10° Bouillon peptoné (pH 7,6) ;
- 11° Bouillon trypsiné de Frieber ;
- 12° Bouillon de foie de Kitt ;
- 13° Petit lait ;
- 14° Lait de vache ;
- 15° Liquide amniotique (de bovidé) ;
- 16° Purée de cerveau ;
- 17° Décoction du contenu du pyomètre ;



FIG. 2. — *Trichomonas fetus* ($\times 2660$), d'après Wenrich et Emmerson.

- 18° Décoction de panse ;
- 19° Gélose N. N. N.

Seul le milieu n° 7 (milieu à l'œuf + sang) donna des résultats positifs. D'autre part, le bouillon peptoné additionné de 10 p. 100 de sérum de cheval permit également la culture ; mais le meilleur milieu fut le bouillon-sang (bouillon peptoné à pH 7,6 additionné de 5-10 p. 100 de sang de cheval, bœuf, chèvre ou mouton). Les *Trichomonas* se multiplient entre pH

5,5 et pH 8,5. L'optimum se trouve entre pH 7 et pH 7,6. Culture à 37°.

En bouillon sang, Witte avait obtenu, pour 3 souches respectivement 59, 63 et 50 passages au moment de la publication de son travail. Il fait remarquer que la multiplication de *Tr. fetus* peut avoir lieu en milieu liquide et ne dépend pas de la présence de particules.

Glaser et Coria (1935) aux Etats-Unis ont obtenu des cultures pures de *Tr. fetus* sur le milieu L.E.B. de Kofoed et Wagener (Locke + œuf + sang v. page 14), après avoir stérilisé les flagellés par leur méthode de migration dans des tubes en « V ».

Notons que Glaser et Coria sont les premiers à avoir purifié une culture de *Trichomonas*.

Riedmüller (1936 a) dans ses études sur les réactions culturelles de *Tr. fetus* a démontré que le sérum était le facteur nécessaire dans le milieu au bouillon sang, et que les globules rouges seuls (lavés ou hémolysés) étaient dépourvus d'action. Il a constaté que le facteur actif du sérum est thermostable et n'est pas détruit par un chauffage d'une heure à 70-90° C. Riedmüller a étudié l'action de plusieurs polysaccharides sur la culture et a noté une action favorisante des sucres fermentés par *Tr. fetus*, le glucose en particulier.

Riedmüller (1936) a également étudié la respiration de *Tr. fetus* (méthode de Warburg) dans l'oxygène pur, dans l'air et dans un mélange de 95 p. 100 de CO + 5 p. 100 O₂. La respiration a été la même dans tous les cas. L'examen spectroscopique n'a montré ni cytochrome, ni autre hémochrome.

La réaction des peroxidases est négative et la présence de catalase n'a pas pu être décelée. Riedmüller constata que le bleu de méthylène en anaérobiose (en tubes de Thunberg) est très rapidement complètement décoloré.

Il peut être intéressant, à ce propos, de rappeler que la respiration des Protozoaires appartient à deux types :

1° Respiration inhibée par HCN et par CO : Trypanosomides (*Strigomonas*, *Leptomonas*, A. Lwoff 1932-33), Chlamydomonadinae (*Polytoma*, M. Lwoff 1934).

2° Respiration insensible à HCN : Ciliés (*Paramœcium*, Col-

pidium, *Glaucoma* Lund 1918, Peters 1929, Gerard et Hyman 1931, Pitts 1932, M. Lwoff 1934) et à CO : *Glaucoma* (M. Lwoff 1934).

La respiration de *Tr. fetus* appartient à ce deuxième type (1).

MATÉRIEL. — Nos premières expériences ont été faites avec une souche de *Tr. fetus* aimablement envoyée par le Professeur J. Witte de Giessen. Cette souche (souche IV de Witte), reçue le 1^{er} décembre 1933, a été entretenue près d'un an et demi. Par la suite, nous avons reçu également du Professeur Witte, en juin 1933, la souche V, qui était à son 202^e passage. Le Professeur L. Riedmüller, de Zurich, a bien voulu nous envoyer le 13 novembre 1933 sa souche 78 qui avait subi 330 passages depuis son isolement en 1933. Enfin, le Professeur R. Glaser nous a donné, en octobre 1933, une souche G. 31 isolée par lui à Princeton (U.S.A.).

MILIEU D'ENTRETIEN. — Nous avons utilisé, comme milieu d'entretien, le sérum coagulé recouvert de bouillon additionné de 3 p. 100 de sérum de cheval. Le bouillon peut être remplacé par de l'eau peptonée (peptone pepsique d'arachide ou peptone de rate Vaillant à 3 p. 100). L'œuf coagulé total additionné de liquide de Locke et de sang défibriné de lapin (milieu L. E. B.) a également donné de bons résultats.

Nous avons également essayé le bouillon + sérum de cheval, mais les résultats ont été très irréguliers, variant avec l'échantillon de sérum, beaucoup plus que dans le milieu au sérum coagulé.

(1) Depuis l'envoi de ce mémoire à l'impression, nous avons pris connaissance du travail de Futamura dont nous n'avons pas pu nous procurer l'original et que nous citons d'après une analyse du *Zentralbl. f. Bakt.* (125, p. 262.). Futamura est arrivé aux mêmes conclusions que les nôtres pour ce qui concerne les fermentations glucidiques de *Trichomonas fetus*. Il a montré, d'autre part, que l'adonite n'est pas attaquée mais qu'il y a production d'acide à partir du mannose. Il a constaté aussi que *Tr. fetus* ne produit ni H₂S ni indol.

Enfin, Futamura a réussi à infecter des cobayes par la voie intrapéritonéale et intravaginale, mais pas par la voie sous-cutanée ou orale.

Etude du comportement des différentes souches de *Trichomonas foetus*.

Nous devons insister sur le fait que les différentes souches de *Tr. foetus* que nous avons eues entre les mains montrent un comportement différent, tant au point de vue des exigences thermiques, qu'à celui des milieux de cultures.

TEMPÉRATURES. — La souche IV de Witte a pu être repiquée régulièrement toutes les trois à quatre semaines à 28°, sur milieu au sérum coagulé + bouillon + sérum de cheval. Les cultures à 37° restaient vivantes de sept à quatorze jours.

La souche V de Witte restait vivante de deux à quatre semaines à 28° ; mais il fut impossible de l'entretenir par repiquage en série à cette température.

La souche 78 de Riedmüller ne s'est pas développée à 28°, mais a pu être entretenue régulièrement à 32° et à 37° comme les souches de Witte. Dans le milieu L.E.B., les flagellés restent vivants de douze à vingt-et-un jours à 37° et jusqu'à trente jours à 32°.

La souche G de Glaser, comme la souche de Riedmüller, ne peut être entretenue à 28°. Les flagellés cependant restent vivants de sept à dix jours à 20°-28°.

MILIEUX. — Les souches européennes d'une part et la souche américaine de l'autre, que nous avons étudiées, présentent, au point de vue de leur aptitude à se multiplier dans les divers milieux de culture, des points communs et des divergences.

1° Les deux souches de Witte, la souche de Riedmüller (souches européennes), et la souche de Glaser (souche américaine), se développent parfaitement dans le milieu L.E.B.

2° Les souches européennes se multiplient en bouillon + sérum de cheval (résultats de Witte et de Riedmüller) et dans le sérum de cheval coagulé + bouillon + sérum de cheval, mais non la souche américaine.

3° La souche de Riedmüller donne régulièrement des cultures

riches dans le bouillon + sérum d'animaux divers, tandis que la souche de Glaser n'a jamais pu être entretenue en série dans le sérum d'aucun des animaux étudiés (voir Tableau n° II), la souche de Witte n'a pas été examinée à ce point de vue.

Fermentation des glucides et des polyalcools.

Nous avons utilisé, pour l'étude des fermentations sucrées, le bouillon ordinaire additionné de 5 p. 100 de sérum de cheval sous huile de vaseline. Le pH est mesuré avec l'électrode de quinhydrone. Comme pour l'*Eutrichomastix colubrorum*, nous étudions comparativement le pH d'un milieu témoin additionné de sucre, non ensemencé, et le pH d'un autre témoin ensemencé sans addition de sucre.

Le pH du témoin sans sucre passe de pH 7 à pH 6,8-6,9.

Les résultats suivants ont été obtenus :

Forte acidification. Le pH tombe de 7,0 à 5,7-6,0 : glucose, galactose, lactose, lévulose, maltose, saccharose, raffinose, dextrine et amidon soluble.

Légère acidification. Le pH tombe à 6,5-6,6, inuline.

Pas d'acidification. Tous les sucres en C₅ : arabinose, xylose et rhamnose, et tous les polyalcools : glycérine, érythrite, sorbite, mannite et dulcité (Cailleau 1934).

Ces résultats ont été obtenus avec la souche IV de Witte ; ils furent identiques avec la souche de Glaser étudiée en bouillon + sérum de chat. Riedmüller (1936a) a obtenu des résultats identiques avec les mêmes sucres. Il a observé en plus, la fermentation du glycogène et du mannose, et la non fermentation de l'inosite.

Métabolisme azoté de *Trichomonas Æetus*.

Comme pour *Eutrichomastix colubrorum*, les changements observés dans la teneur en azote protéique et non protéique, en azote aminé et ammoniacal, ont été négligeables (inférieur à 1 p. 100 de la quantité d'azote total).

Nous pouvons donc dire que *Trichomonas foetus* comme *Eutrichomastix colubrorum* n'excrète pas de ferment protéolytique et qu'il ne produit pas, pour ainsi dire, d'azote ammoniacal.

Réactions en présence du sérum de divers animaux.

Nous avons examiné la valeur, pour *Tr. foetus*, des sérums des 9 espèces animales déjà étudiées dans les expériences avec *Eutr. colubrorum*. Les mêmes précautions ont été observées et la même technique employée. Les deux souches utilisées dans ces expériences ont été la souche 78 de Riedmüller et la souche G. de Glaser.

La souche G. de Glaser, s'étant développée irrégulièrement et faiblement, contrairement à la souche européenne, nous indiquons séparément les résultats.

RÉSULTATS AVEC LA SOUCHE 78 DE RIEDMÜLLER. — *Homme*. — Le sérum humain se trouve parmi les sérums favorables. Le sérum de deux individus a donné 4 séries de 5, 10, 11 et 12 passages. (Notons encore que dans toutes ces expériences où le nombre de repiquages dépasse 10, nous arrêtons volontairement la série.)

Chat. — Le sérum de chat peut également être considéré comme excellent pour l'entretien de *Tr. foetus*. Quatre séries de 15, 12, 10 et 12 repiquages ont été faites avec le sérum de deux animaux différents.

Cheval. — Comme nous l'avons indiqué précédemment, le bouillon + sérum de cheval, ne s'est pas montré un milieu très favorable pour la culture de *Tr. foetus*. Nous n'avons réussi à obtenir qu'une série de 11 repiquages sur 4 séries avec le sérum de 3 individus.

Mouton. — Le sérum d'un mouton a permis une fois 2, une fois 3 et une fois 5 repiquages. Le sérum d'un autre animal s'est montré négatif.

Lapin. — Le sérum de lapin s'est montré en général défavorable pour la multiplication des flagellés. 3 sérums sur 4

TABLEAU IIa. — *Trichomonas fetus*. Souche Riedmüller.

SÉRUM	ANIMAL	SÉRIES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL des repiquages
Homme.	1	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	10
	1	B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	11
	1	C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	12
	2	D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	12
Chat.	1	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	15
	1	B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	10
	1	C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	12
	2	D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	12
Cheval	1	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	11
	1	B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	2	C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	3	D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
Mouton.	1	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	1	B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	1	C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	2	D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
Lapin.	1	A	+	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	14 (2)
	2	B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	3	C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	4	D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
Cobaye.	1	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	10
	2, 3	B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	12
	4, 5	C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	14
	6, 7	D	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
Rat.	1	A	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	2	B	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	3	C	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	4	D	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Pigeon.	1	A	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	2	B	++	±	—	—	—	—	—	—	—	—	
	3	C	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	4	D	+++	+++	±	—	—	—	—	—	—	—	
Poule.	1	A	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	1	B	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	1	C	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	
	2	D	+++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	

(1) Sérum d'un autre individu.

(2) Sérum mélangé de 3 lapins différents.

TABLEAU II b. — *Trichomonas fœtus*. Souche Glaser.

Poule.	Pigeon.	Rat.	Cobaye.	Lapin.	Mouton.	Cheval.	Chat.	Homme.	SÉRUM
1 } 1 } 1 } 2 }	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3, 4 5	1 2 3 4	1 } 1 } 1 } 2 }	1 } 1 } 1 } 2 }	1 } 1 } 1 } 2 }	1 } 1 } 2 } 2 }	ANIMAL
A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	SÉRIES
+++ ++ ++ ++	++++ ++++ ++++ ++	± ± ± ±	+++ +++ +++ ++	+ +++ ± ±	+++ +++ ± ++	+++ +++ +++ ±	+++ +++ +++ ±	+++ +++ +++ ++	1
± — — —	+++ ++ — —	— — — —	+++ ++ — —	— — — —	+ + — +	+++ +++ ++ —	+++ +++ ++ —	+++ +++ ++ —	2
— + — —	— + — —	— — — —	+++ +++ +++ ++	— — — —	— — — —	+++ +++ ++ —	+++ +++ ++ —	+++ +++ ++ —	3
— — — —	— — — —	— — — —	+ (1) — — —	— — — —	— — — —	++ ++ — —	++ ++ — —	+++ +++ ++ —	4
— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	+++ +++ ++ —	5
— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	+++ +++ ++ —	6
— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	+++ +++ ++ —	7
— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	+++ +++ ++ —	8
— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	+++ +++ ++ —	9
— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	+++ +++ ++ —	10
								42	TOTAL des repiquages

(1) +, Sérum d'un autre individu.

ont donné des résultats négatifs. Un quatrième sérum (il s'agissait d'un mélange de 3 sérums différents, mis en tube plus de trois mois auparavant) a permis d'obtenir 14 repiquages en série.

Cobaye. — Le sérum de cobaye est très favorable. Avec le sérum de 6 animaux, nous avons pu obtenir respectivement 3 séries de 10, 12 et 14 repiquages. Avec le sérum d'un septième individu, nous avons obtenu 4 repiquages (série interrompue faute de sérum).

Rat. — 4 séries avec 4 animaux différents ont toutes été négatives.

Pigeon. — Comme pour *Eutr. colubrorum*, le sérum de pigeon s'est toujours montré négatif (sérum de 4 individus différents).

Poule. — Le sérum de poule donne également des résultats négatifs. (4 séries avec 2 individus différents).

SOUCHE DE GLASER. — La souche de Glaser est, nous l'avons dit, infiniment plus sensible que la souche de Riedmüller. Aucun des sérums n'a pu donner de résultats nets.

Avec un sérum humain, nous avons obtenu une fois 12 repiquages, mais dans une autre série d'expériences, avec le même sérum, il n'y a eu que 2 repiquages positifs. Le sérum d'un autre individu s'est également montré négatif.

Nous avons pu obtenir, avec le sérum de chat, deux fois 4 repiquages et une fois 2 repiquages avec le sérum d'un individu. Le sérum d'un deuxième animal s'est montré négatif.

Le sérum de cobaye a permis une fois 3 repiquages (cultures riches), mais un autre sérum a dû être employé par la suite. La culture s'est arrêtée après 1 repiquage.

Les sérums de tous les autres animaux se sont montrés négatifs.

Malgré la plus grande sensibilité de la souche Glaser, les quelques résultats positifs indiquent une certaine concordance avec les résultats obtenus avec la souche Riedmüller, car pour celle-là comme pour celle-ci, les sérums les plus favorables ont été le sérum de chat, de cobaye et d'homme.

Essais de détermination de la cause de l'absence d'action des sérums.

Nous avons étudié (1937 a) les causes de l'absence d'action du sérum de cheval pour *Trichomonas columbae* (voir page 41) et nous avons montré que l'absence d'action du sérum de cheval était due : 1° à son action agglutinante; 2° à l'absence d'un facteur de croissance.

Nous avons essayé de reprendre ces expériences avec *Tr. foetus*.

Le sérum de poule à 5 et à 10 p. 100 n'exerce aucune action agglutinante sur *Tr. foetus* (souche Riedmüller). D'ailleurs, dans le bouillon + sérum de poule, on obtient toujours 1 ou même 2 repiquages. Nous avons cependant étudié comparativement le sérum de poule, non chauffé, et le même sérum chauffé à 56 ou 70°. (Le chauffage à 70° est fait après dilution en bouillon). Le développement des cultures a été identique au premier repiquage dans le bouillon + sérum non chauffé et le bouillon + sérum chauffé à 56°. Dans le bouillon + sérum chauffé à 70° la culture a été abondante, mais le deuxième repiquage a été négatif dans les trois milieux.

Il semble donc bien que l'absence d'action du sérum de poule tienne à l'absence d'un facteur de croissance.

Nous avons alors essayé de voir si l'on n'obtiendrait pas, avec le sérum de cheval chauffé à 70°, des résultats plus réguliers. Des tubes de bouillon ont été additionnés de sérum de cheval à 5 et 10 p. 100. Une série a été conservée comme témoin, une autre a été chauffée trente minutes à 56°, et une troisième, trente minutes à 70°.

Il n'y a pas eu de différences entre le sérum non chauffé et le sérum chauffé à 56°; les deux ont donné au maximum 2 repiquages positifs.

Le sérum chauffé à 70° a donné des résultats un peu plus favorables, mais la culture a été négative au quatrième passage.

Ces expériences avec le sérum de poule et avec le sérum

de cheval ont été reprises avec la souche américaine de Glaser; les résultats ont été entièrement négatifs.

Etant donné que le chauffage à 70° produit une coagulation du sérum, nous avons essayé de voir si la légère amélioration constatée avec le sérum chauffé pouvait être due à la présence de particules dans le milieu. Du bouillon, contenant 5 p. 100 de sérum de cheval non chauffé, a été additionné des substances suivantes :

1° Blanc d'œuf (coagulé à 70° après dilution avec une partie égale de bouillon) ;

2° Corps de *Bact. coli* tués par la chaleur ;

3° Emulsion de foie de cheval stérilisé à 120°.

Dans ces trois milieux, le premier repiquage fut positif, le second négatif, sauf pour le milieu bouillon sérum + foie, qui a permis 3 repiquages.

Il sera très difficile de tirer une conclusion de ces expériences, tant que l'on ne connaîtra pas la nature du facteur de croissance contenu dans le sérum.

TRICHOMONAS COLUMBÆ (Rivolta 1878)

Introduction et Historique.

Trichomonas columbæ fut découvert et décrit en 1878 par Rivolta, et retrouvé ensuite par de nombreux auteurs dans diverses parties du monde. On aurait pu supposer que ce flagellé, se trouvant à l'état pur dans les organes des pigeons malades, dût être un des premiers *Trichomonas* isolés en culture. Cependant la culture bactériologiquement pure de *Tr. columbæ* ne fut réalisée qu'en 1933, par A. Bos, à Utrecht.

Bos obtint des cultures à partir de foyers nécrotiques de pigeons morts de trichomoniose. Les premières cultures de Bos étaient impures, mais il ne tarda pas à réaliser une culture pure à partir du sang du cœur ou de foyers nécrotiques du foie de pigeons sacrifiés en pleine infection.

C'est avec ces cultures que Bos démontra pour la première fois que le flagellé est bien l'agent étiologique de la maladie du pigeon, fait qui a été confirmé par Cauthens et Harris (1935).

Bos avait cultivé *Tr. columbæ* dans le milieu L. E. S. (œuf coagulé + solution de Locke additionné de 10 p. 100 de sérum de cheval) et en bouillon + foie. Le bouillon peptoné + sang a donné des résultats négatifs. Le milieu de Maciel modifié

(sérum de cheval additionné d'une solution de chlorure de sodium à 0,5 p. 100, milieu stérilisé une demi-heure à 110°) a permis la survie, mais sans multiplication (1).

Matériel et Recherches préliminaires.

Nous avons utilisé dans nos expériences une souche aimablement envoyée par le Professeur A. Bos.

Nos recherches préliminaires ont eu pour but de définir un milieu simple qui puisse servir de point de départ à un isolement des facteurs de croissance. Toutes ces recherches ont été faites dans des milieux de pH 6,6 à 7,6 et à une température de 37°, sauf contre-indication.

Nous avons essayé plusieurs types de milieux :

I. — MILIEUX CONTENANT UN SUBSTRATUM SOLIDE.

A. SÉRUM DE CHEVAL COAGULÉ. — 2 à 3 cent. cubes de sérum de cheval stérile sont introduits dans un tube qui est incliné et chauffé à 70° pendant trente minutes. On ajoute ensuite aseptiquement une des solutions stériles suivantes :

- a) Bouillon peptoné ordinaire.
- b) Eau peptonée (peptone de rate à 3 p. 100 ou peptone peptique d'arachide à 3 p. 100. Vaillant).
- c) Solution de Locke.

A chacun de ces milieux, on ajoute soit 5 p. 100 de sérum de cheval, soit 5 p. 100 d'albumine d'œuf.

B. MILIEU A BASE D'ŒUF COAGULÉ. — Nous avons employé deux types de milieux : l'un dont la partie solide était constituée par de l'œuf total, l'autre par des blancs d'œuf (dilués avec de la solution de Locke).

(1) Depuis l'envoi de ce mémoire à l'impression, nous avons pris connaissance du travail de Schaaf et Schmitt (1937) qui ont étudiés le développement de *Trichomonas columbæ* dans une vingtaine de milieux. Ils signalent entre autre, comme favorables, une série de milieux au sérum de cheval qui nous ont donné des résultats négatifs (Voir p. 45).

Nous avons ajouté à ces milieux solides les mêmes liquides qu'au milieu à base de sérum de cheval.

Tous ces milieux ont donné des résultats négatifs, excepté le sérum coagulé + bouillon + sérum de cheval, le sérum coagulé + liquide de Locke + albumine d'œuf, et le milieu à base d'œuf coagulé + bouillon ou à base d'œuf coagulé + solution de Locke + sérum de cheval ou albumine d'œuf, qui ont donné des résultats irréguliers.

II. — MILIEUX LIQUIDES.

A. MILIEU A BASE D'AUTOLYSAT DE LEVURE, ADDITIONNÉ A RAI-
SON DE 10 p. 100 DE :

- a) liquide d'ascite;
- b) sérum de cheval;
- c) albumine d'œuf;
- d) extrait de foie;
- e) jus de carotte;
- f) sérum de cheval + albumine d'œuf.

Tous ces milieux ont donné des résultats négatifs.

B. MILIEU A BASE DE BOUILLON ORDINAIRE. — Additionné des mêmes substances que précédemment (A) et en plus d'ami-
don soluble à 5 p. 100.

Seul, le bouillon additionné d'extrait de foie a donné des résultats positifs; mais les cultures ont été pauvres et le déve-
loppement irrégulier.

C. MILIEUX A BASE DE PEPTONE D'ARACHIDE A 3 p. 100 (première
série) ET DE PEPTONE DE RATE A 3 p. 100 (deuxième série) addi-
tionnés des mêmes substances que l'autolysat de levure
(milieu A).

Les résultats ont été entièrement négatifs.

D. MILIEU A L'EXTRAIT DE FOIE, additionné ou non de sérum
de cheval (à 10 p. 100).

Les résultats ont été irréguliers.

III. — MILIEU AU FOIE.

Le foie de veau frais est découpé en petits fragments qui sont introduits dans des tubes et additionnés de 3 à 4 volumes des liquides suivants :

- a) eau distillée;
- b) eau physiologique;
- c) solution de Locke;
- d) peptone d'arachide à 1 p. 100;
- e) solution à 3 p. 100 de peptone de rate ou d'arachide;
- f) bouillon ordinaire;
- g) autolysat de levure;
- h) extrait de foie;
- i) solution tampon de phosphates;
- j) solution de phosphates + lécithine + cholestérol.

L'autolysat de levure a été obtenu par autolyse de trois jours à 45° de levure de boulangerie (voir Lwoff, 1932).

La solution de phosphate était constituée de la façon suivante : NaCl, 0,5; KCl, 0,1; MgCl₂, 0,005; CaCl₂, 0,005; K₂HPO₄, 0,2; KH₂PO₄, 0,15; NaHCO₃, 0,1; eau distillée 100. C'est cette même solution qui a été utilisée dans le milieu (j) additionné de 0,08 p. 100 de gélose et de 2 p. 100 d'une solution saturée de lécithine et de cholestérol, dans l'alcool à 80°.

L'extrait de foie (milieu h) a été préparé en extrayant 1 volume de foie broyé avec 2 volumes d'eau distillée dans un bain-marie à 100° pendant une heure ; le liquide surnageant après décantation est filtré sur une bougie Chamberland L3.

Tous les milieux au foie, sauf l'autolysat de levure, ont donné des résultats positifs. Il faut noter cependant que la proportion de foie joue un rôle assez important. Quand la partie liquide est constituée par un milieu non nutritif (eau distillée, eau physiologique, etc.), il faut que le rapport :

$$\frac{\text{volume du foie}}{\text{volume du liquide}} \text{ soit } \frac{1}{3} \text{ au minimum.}$$

Si le milieu liquide est constitué par du bouillon peptoné

ou de l'extrait de foie, il suffit que ce rapport soit de $1/6$.

La quantité de foie qui doit être ajoutée dans l'eau peptonée pour assurer la culture, est supérieure à celle qui doit être ajoutée au bouillon. Si la quantité de foie ne représente que la huitième ou la dixième partie du volume du liquide, aucun des milieux n'est utilisable.

IV. — INFLUENCE DU pH SUR LES CULTURES.

Dans le milieu bouillon-foie, nous avons constaté qu'au bout de deux à trois jours les cultures sont très abondantes et qu'elles décroissent ensuite pour mourir vers le cinquième ou le sixième jour. Il est très rare que les *Trichomonas* vivent plus longtemps, mais exceptionnellement ils survivent neuf à dix jours. Ce qui concorde avec les observations de Bos.

Dans ces conditions, le pH qui au début est au voisinage de 7,0 tombe jusqu'à 4,5-4,6 à la fin de la culture. Nous avons pensé que cette acidification était une des raisons de la mort des *Trichomonas*. En effet, par addition au milieu, comme tampon, de carbonate de calcium stérile (environ $1/2$ cent. cube d'une suspension à 50 p. 100, pour 8 cent. cubes de milieu), nous avons obtenu des cultures de quatorze à vingt-cinq jours. La survie des *Trichomonas* peut être également prolongée, en absence de carbonate de calcium, si les cultures sont faites à 32°C; les repiquages des cultures peuvent n'être effectués alors que tous les quatorze à vingt et un jours.

De plus, à 32° et en présence de CaCO_3 , la durée moyenne de la culture peut se prolonger jusqu'à trente-quatre jours.

V. — INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LES CULTURES.

Tous nos essais pour obtenir des cultures de *Trichomonas columbæ* à des températures inférieures à 32° ont échoué. Les flagellés peuvent vivre une semaine à 30°, se multiplient, parfois lentement, mais les résultats sont très irréguliers. A 28°, il n'y a pas de multiplication, et les cultures meurent en quelques jours. Par contre, à une température de 40° (qui se rapproche de la température des pigeons), la multiplica-

tion est accélérée. Une température de 44° peut même être supportée pendant plusieurs jours par *Tr. columbæ*, mais sans qu'il y ait multiplication.

Etude de différents tissus et organes.

Conformément à la conclusion de Bos, le foie de veau ajouté au bouillon permet la culture de *Tr. columbæ*. Nous avons obtenu des résultats positifs avec du foie de pigeon et de lapin. Le foie de pigeon donne des résultats aussi favorables que le foie de veau. Avec le foie de lapin, le développement des cultures est plus lent.

D'autre part, nous avons essayé de déterminer si l'action du foie était ou non spécifique. Les organes suivants de lapin : rate, cœur et intestin, ont donné les mêmes résultats favorables que le foie de veau. Les organes et tissus suivants : cerveau, muscle, pancréas, rein, surrénale, testicule, permettent également l'entretien en série de *Tr. columbæ*.

Fermentation des glucides et polyalcools.

Les expériences ont été effectuées en bouillon + intestin de lapin, dans les mêmes conditions et avec les méthodes déjà décrites (voir p. 20). Le pH du témoin, sans sucre, est à 6,9 avant l'ensemencement et 6,5 après le développement de la culture de *Trichomonas*. Nous ne concluons à une attaque des glucides que lorsque le pH est amené au-dessous de 6,5.

Nos résultats sont classés de la façon suivante :

Forte acidification. — Le pH tombe de 6,9 à 5,7-6,0 : glucose, galactose, maltose, saccharose, dextrine et amidon soluble.

Légère acidification. — Le pH tombe à 6,1-6,3 ; lévulose, lactose et inuline.

Peu ou pas d'acidification. — Le pH ne descend pas au-dessous de 6,5 ; arabinose, xylose, rhamnose, raffinose, glycérine, érythrite, sorbite, mannite et dulcité.

TABLÉAU III. — *Trichomonas columbæ*. Réaction en présence de divers sérums.

SÉRUM	ANIMAL	SÉRIES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL des repiquages
Homme.	1 } 1 } 1 } 2 }	A B C D	± ± + ±	— — — —									
Chat.	1 } 1 } 1 } 2 }	A B C D	± ± ± ±	— — — —									
Cheval.	1 } 1 } 2 } 3 }	A B C D	+ ± ± ±	— — — —									
Mouton.	1 } 1 } 1 } 2 }	A B C D	± ± ++ +	— — ± —	—								
Lapin.	1 } (1) 2 } (1) 2 } 3 }	A B C D	± +++ +++ +	+ +++ —	± ++	— —							
Cobaye.	1 } 2 } 3, 4 } 5, 6 }	A B C D	+++ +++ +++ +++	+++ ++ +++ +++	+++ — +++ +++	±+ — (2)	— +++			+++	+++	+++	11
Rat.	1 } 2 } 3, 4, 5 } 6, 7, 8 }	A B C D	+++ ++ +++ +++	+++ — (3) +++ +++	+++ (2) +++ +++	+++ +++ +++ (2)	+++ +++ +++ (2)	+++	+++	+++		+++ —	8 10 9
Pigeon.	1 } 2 } 3 } 4 }	A B C D	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++	+++	+++	+++	+++	+++ +++ +++ +++	12 15 10 12
Poule.	1 } 1 } 1 } 2 }	A B C D	+++ +++ +++ +++	+++ + + +++	— — — ++								

(1) Sérum mélangé de trois lapins différents.

(2) Sérum d'un autre individu.

(3) Même expérience répétée trois fois avec les mêmes résultats.

Culture de *Tr. columbæ* en présence de divers sérums.

Nous avons constaté, comme Bos (1933a) que *Tr. columbæ* ne se multiplie pas en bouillon additionné de sérum de lapin ou de cheval. Nous avons alors étudié systématiquement, comme nous l'avons fait pour *Eutr. colubrorum* et *Tr. fætus*, l'action du sérum de divers animaux sur la multiplication de *Tr. columbæ*.

Les sérums inactivés par chauffage de trente minutes à 56°, trois fois à vingt-quatre heures d'intervalle, sont ajoutés au bouillon à raison de 3 à 4 p. 100.

Le sérum de pigeon (Cailleau 1937 a) est extrêmement favorable. Les sérums de 4 individus différents ont permis respectivement 12, 15, 10 et 12 repiquages.

Les sérums de 8 rats ont été étudiés, ceux de 6 d'entre eux ont donné des résultats positifs : 8, 10 et 9 repiquages en série.

Le sérum de cobaye a donné des résultats positifs nets dans deux cas : 11 repiquages en série avec le sérum de 2 cobayes différents. Dans les autres cas, les cultures ont été arrêtées au 2° et au 4° passage.

Avec le sérum de poule, nous n'avons obtenu que 2 repiquages avec un sérum, 3 repiquages avec un autre.

Le sérum humain et les sérums de chat, cheval, mouton et lapin ont donné des résultats négatifs (Tableau n° III).

Analyse de l'absence d'action du sérum de cheval.

Nous avons remarqué au cours de nos expériences (Cailleau 1937a) une action agglutinante régulière très marquée du sérum de cheval et du sérum de chat.

Le fait que *Tr. columbæ* ne se multiplie pas en bouillon + sérum de cheval pourrait tenir à deux causes :

1° A l'action léthale du sérum ;

2° A l'absence du ou des facteurs de croissance dans les sérums actifs.

Nous avons donc entrepris des expériences pour tenter de

résoudre ces questions. Nous avons d'abord étudié les modalités de l'action agglutinante du sérum de cheval.

Notons pour commencer que nous avons utilisé le sérum inactivé. Les expériences ont été faites dans une chambre étuve de Foot à 37°, en ajoutant une quantité déterminée de culture en bouillon à une quantité variable de sérum.

Pour une concentration de 5 p. 100 de sérum de cheval, l'agglutination commence en moins de trois minutes et les mouvements des flagellés sont ralentis. Pour une concentration de 50 p. 100 de sérum de cheval les flagellés sont immobilisés presque immédiatement, ce qui les empêche de s'agglutiner (expériences faites sur lame). La production des courants qui amènent en contact les organismes immobiles, entraîne la formation de masses de flagellés coalescents.

Cette propriété agglutinante du sérum de cheval, qui, nous l'avons dit, n'est pas détruite par chauffage à 56°, disparaît par chauffage d'une demi-heure à 70° C. Le sérum est dilué en bouillon avant chauffage. Néanmoins, le sérum chauffé à 70° ne permet pas la culture. L'absence d'action du sérum du cheval n'est donc pas due uniquement à son action agglutinante.

En effet, nous avons constaté que le chauffage à 70°, n'est pas responsable de cette absence d'activité, car le sérum de pigeon chauffé à la même température et dans les mêmes conditions ne perd pas son activité. Nous savons d'ailleurs que les facteurs de croissance pour *Tr. columbae* sont thermostables puisqu'ils résistent dans le foie à un chauffage de vingt minutes à 120°.

Nous nous sommes assurée que le sérum de cheval chauffé à 56° ne renferme pas de substances empêchantes. Ajouté au bouillon + sérum de pigeon à des concentrations variant entre 1,5 et 15 p. 100, il n'empêche pas le développement de la culture. Cependant, si la multiplication n'est pas empêchée, il y a production de grands amas de flagellés qui se dissocient vers la quarante-huitième heure environ dans des concentrations de sérum de cheval inférieures à 10 p. 100. Pour une concentration en sérum de cheval supérieure à 15 p. 100 la multiplication est arrêtée.

Nous nous sommes assurée d'autre part, que le sérum de cheval chauffé à 70° n'est pas toxique, car ajouté au bouillon + foie à raison de 30 p. 100, il n'empêche pas la multiplication des flagellés.

De ces expériences nous pouvons donc conclure que si le sérum de cheval inactivé est incapable, ajouté au bouillon, de provoquer la culture de *Trichomonas columbæ*, cela tient à deux raisons :

1° A son action agglutinante ;

2° A l'absence d'un facteur de croissance ou au fait que ce facteur existe en quantité insuffisante ou sous une forme masquée inutilisable.

Il faut noter d'ailleurs que le sérum de pigeon, lui-même cependant si favorable, possède également une action agglutinante. Mais celle-ci ne se manifeste qu'à des titres très élevés. Pour une concentration de 5 p. 100, il n'y a pas d'agglutination, et pour une concentration de 50 p. 100, l'agglutination se produit, mais la mobilité des flagellés est conservée et les amas se dissocient après un séjour de deux à trois heures à 37°.

On voit donc que les sérums des diverses espèces animales, considérés comme facteur de croissance, se comportent de façon variable. Anticipant sur les résultats qui vont suivre, nous pouvons dire que dans le sérum de pigeon, comme dans le foie, les deux facteurs de croissance sont présents dont l'un est le cholestérol. Comme le cholestérol existe dans tous les sérums, nous pouvons conclure que c'est le second facteur dont la nature est encore inconnue, qui manque dans les sérums inactifs.

En effet, si nous ajoutons par exemple, du sérum de cheval à raison de 2 p. 100, qui normalement, nous l'avons vu page 41, donne seul des résultats négatifs, à du bouillon + foie épuisé par l'acétone (voir plus loin, page 45), nous obtenons une culture riche et repiquable en série. Le sérum de cheval apporte donc le cholestérol indispensable.

LES STÉROLS, FACTEURS DE CROISSANCE POUR *TRICHOMONAS COLUMBÆ*

Recherches préliminaires.

FRACTIONNEMENT DU FOIE DE VEAU.

Toutes nos tentatives pour remplacer le sérum de pigeon par des substances plus simples (albumine, caséine, bactéries tuées, etc...), ont échoué. Nous avons alors tenté de déterminer la nature de la ou des substances actives du foie.

I. EXTRACTION A L'EAU. — On broie 100 grammes de foie de veau et l'on extrait à trois reprises avec 400 cent. cubes d'eau distillée, une heure au bain-marie bouillant. Les liquides surnageants sont décantés et le résidu est desséché dans le vide sulfurique pendant quarante-huit heures, puis à l'étuve à 85° pendant une heure.

II. EXTRACTION A L'ALCOOL. — On broie 100 grammes de foie de veau, on l'extrait ensuite dans un Soxhlet par 200 cent. cubes d'alcool absolu pendant trois à quatre heures. L'extrait alcoolique est conservé et l'épuisement du foie répété avec 200 cent. cubes d'alcool absolu pendant trois à quatre heures ou jusqu'à ce que le liquide qui entoure la cartouche devienne incolore. Le résidu de foie est ensuite desséché par la méthode employée auparavant (I) et les extraits alcooliques sont réunis et concentrés par distillation jusqu'à un volume de 20 à 30 cent. cubes, et ensuite évaporés dans un dessiccateur.

III. EXTRACTION PAR L'ACÉTONE. — Les mêmes procédés que pour l'extraction et la dessiccation du foie par l'alcool (II) ont été utilisés pour l'extraction par l'acétone.

IV. EXTRACTION PAR L'ÉTHÉR. — Les mêmes procédés que précédemment ont été employés ; mais l'extraction dure douze à quatorze heures, en raison de la température d'ébullition de l'éther.

Les 4 extraits et résidus ont été ajoutés séparément ou ensemble au bouillon et ont donné les résultats suivants :

1° Aucun des 4 extraits ajoutés au bouillon ne peut remplacer le foie total.

2° Le foie, extrait par l'eau et l'éther, ajouté au bouillon, permet le développement des flagellés comme le foie total.

3° Le foie extrait par l'alcool pendant huit heures donne des cultures moins nettes et plus lentes. Si l'extraction est poussée plus loin (400 cent. cubes d'alcool et huit heures supplémentaires d'extraction), on peut obtenir des échantillons de foie qui ne permettent pas la culture de *Tr. columbæ*.

4° Le foie épuisé par l'acétone ne permet jamais l'entretien de la culture.

L'acétone a donc dissous une substance indispensable à la nutrition du *Trichomonas*. En effet, l'addition au bouillon + résidu de foie extrait par l'acétone, de l'extrait acétonique de foie, permet la culture des flagellés comme le foie total. Le tableau IV résume ces expériences et montre qu'il y

TABLEAU IV.

Bouillon peptoné	0
Bouillon peptoné + foie de veau	+
Bouillon peptoné + foie extrait par l'eau	+
Bouillon peptoné + foie extrait par l'alcool	+
Bouillon peptoné + foie extrait par l'éther	+
Bouillon peptoné + foie extrait par l'acétone	0
Bouillon peptoné + extrait aqueux de foie	0
Bouillon peptoné + extrait alcoolique de foie	0
Bouillon peptoné + extrait éthéré de foie	0
Bouillon peptoné + extrait acétonique de foie	0
Bouillon peptoné + foie extrait par l'acétone + extrait acétonique	+

a, dans le foie, 2 éléments indispensables : 1° une substance

soluble dans l'acétone ; 2° le résidu insoluble que nous n'avons jusqu'ici pas réussi à remplacer par des éléments nutritifs figurés comme des corps de *B. coli* tués par la chaleur, la caséine, etc...

Les deux substances sont thermostables car elles résistent à une température de 120° pendant vingt minutes (stérilisation à l'autoclave du bouillon + foie).

ETUDE DES DIVERSES SUBSTANCES.

Nous avons alors cherché à déterminer la nature de la substance active, soluble dans l'acétone (Cailleau 1933).

Dans les expériences suivantes, le foie de veau a été extrait par l'acétone pendant six à huit heures, et ensuite extrait par l'alcool absolu pendant un temps égal. Le résidu desséché ajouté au bouillon ne permet pas la culture de *Tr. columbae*. Le bouillon + foie sert de témoin (1^{er} repiquage ; survie ou légère multiplication, 2^e repiquage : toujours négatif).

Les substances suivantes ont été étudiées : jaune d'œuf, les produits d'hydrolyse de la lécithine (lécithine chauffée vingt minutes à 120°), la bile, les acides oléique, palmitique et stéarique, le chlorhydrate de choline, l'ergostérol et finalement le cholestérol.

La bile stérilisée à part par filtration, et le jaune d'œuf prélevé aseptiquement, ont été ajoutés au milieu après stérilisation. Le cholestérol était ajouté au milieu sous forme d'une solution alcoolique, après stérilisation ou sous forme solide avant la stérilisation. Les autres substances ont été ajoutées en quantité variables avant la stérilisation du milieu (vingt minutes à 120°).

Le tableau suivant montre bien que seules les substances renfermant de la lécithine ou du cholestérol peuvent remplacer l'extrait acétonique dans le bouillon + résidu de foie.

Le jaune d'œuf, la bile, la lécithine et le cholestérol ont tous donné des résultats positifs (au moins 6 repiquages en série sont effectués avant que la substance soit considérée comme favorable).

Les 3 acides gras : oléique, stéarique et palmitique, se sont

montrés régulièrement négatifs, donnant les mêmes résultats que le témoin.

Le chlorhydrate de choline et l'ergostérol ont donné des résultats plus encourageants mais, dans ces expériences, n'ont

TABLEAU V.

BOUILLON PEPTONÉ + RÉSIDU DE FOIE extrait par l'acétone	NOMBRE DE REPIQUAGES					TOTAL des repiquages
	1	2	3	4	5	
+ 0 (Témoin)	±	0				8
+ Jaune d'œuf	+++	+++	+++	+++	+++	13
+ Lécithine hydrolysée	+++	+++	+++	+++	+++	8
+ Bile	+++	+++	+++	+++	+++	9
+ Solution alcoolique de cholestérol.	+++	+++	+++	+++	+++	
+ Chlorhydrate de choline	+++	++	+	0		
+ Ergostérol	++	±	0			

pas pu maintenir la culture de *Tr. columbæ* pendant plus de 2 à 3 repiquages (1).

Etude du cholestérol.

Nos premières expériences avaient été réalisées avec un échantillon de cholestérol du commerce (Merck). Le cholestérol n'ayant jamais été signalé comme facteur de croissance, nous avons pensé (1935) que l'action du cholestérol pouvait être due à une impureté adsorbée, hypothèse qui semblait s'imposer d'autant plus que la quantité de cholestérol nécessaire pour assurer la multiplication des flagellés était relativement élevée (dilution : 1/10.000).

Par la suite, nous avons eu à notre disposition grâce à l'obli-

(1) Ces résultats négatifs avec l'ergostérol chauffé à 120° ne concordent pas avec les faits observés plus loin. (Voir page 57) avec l'ergostérol ajouté en solution alcoolique. Nous remarquons ici que l'ergostérol est très probablement hydrolysé par le chauffage de vingt minutes à 120°.

geance de M. Pénau. 2 autres échantillons de cholestérol pur, l'un extrait de la cervelle de bœuf, l'autre du foie de flétan (Pleuronectidé). Ils ont donné les mêmes résultats positifs que le cholestérol Merck (Cailleau 1936).

La question a pu être définitivement tranchée, grâce à l'utilisation d'un cholestérol pur préparé à notre intention par M. André Girard. La purification a été effectuée de la manière suivante : du cholestérol pur ordinaire, provenant de la moelle de bœuf, est transformé en acétate et dibromé sur la double liaison. L'acétate de dibromocholestérol est ensuite recrystallisé 4 fois dans l'acétone, puis débromé par le zinc et saponifié par la potasse. Finalement le cholestérol est recrystallisé 3 fois en présence de noir. « On peut tenir pour certain », nous dit M. A. Girard, « qu'un semblable traitement a éliminé toute impureté quelle qu'elle soit ».

Ce cholestérol pur, ajouté au milieu bouillon + foie épuisé par l'acétone, a permis un développement abondant et régulier (à 37°) des cultures de *Trichomonas columbæ* (plus de 14 repiquages en série). Les témoins, sans cholestérol, sont positifs au 1^{er} repiquage, mais toujours négatifs au 2^e. Nous pouvons conclure avec certitude que le cholestérol est l'un des facteurs de croissance nécessaires à *Trichomonas columbæ*.

Nous avons dit que le cholestérol est nécessaire en quantité relativement élevée. Ceci tient très probablement à ce qu'une très faible partie seulement du cholestérol introduit dans le milieu est utilisé, ou même utilisable. En effet, nous ajoutons au bouillon quelques gouttes d'une solution de cholestérol dans l'alcool à 100°. Il se forme ainsi une suspension de particules de cholestérol plus ou moins grandes dont beaucoup sont certainement inutilisables.

Etude de l'activité de divers stérols.

Ayant constaté que le cholestérol est un facteur de croissance pour *Tr. columbæ*, nous nous sommes demandé s'il ne pouvait être remplacé par des stérols voisins, et nous avons

essayé de déterminer l'étendue des variations compatibles avec le maintien de l'activité (1) [1936c, 1937b].

La chimie des stérols a fait depuis quelques années des progrès considérables. Ce développement est dû en partie au fait que les hormones sexuelles d'une part, certaines vitamines d'autre part, ont été reconnues comme étant des dérivés des

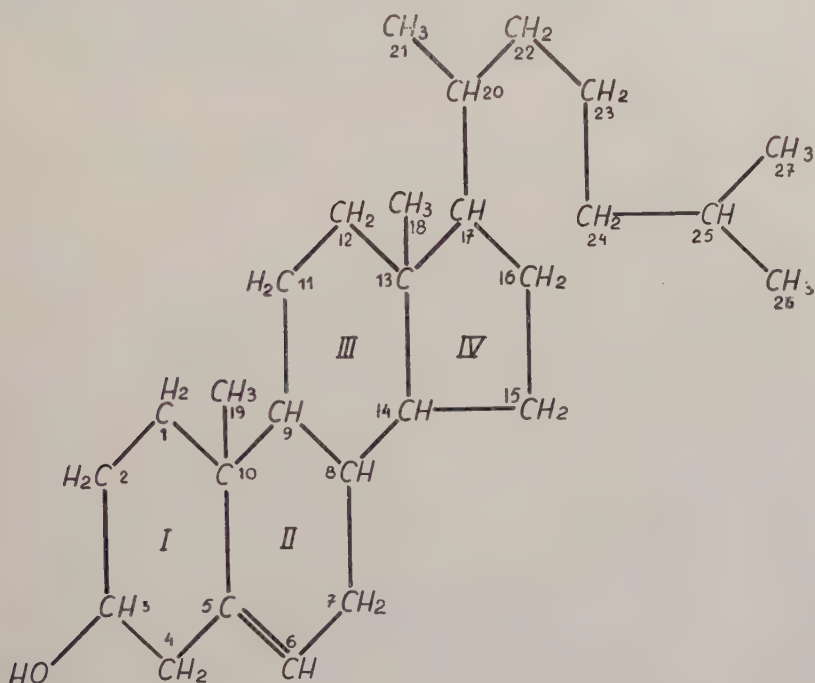


Fig. 1.

stérols (Windaus, Rosenheim, Butenandt, Ruzicka, Girard, Heilbron, etc...).

Nous indiquons ici la formule du cholestérol pour faciliter les comparaisons avec les autres corps. Ce n'est qu'en 1932,

(1) Pour tout ce qui concerne la question de la chimie des stérols, nous renvoyons aux volumes suivants. The Chemistry of Natural Products Related to Phenanthrene, L. E. FIESER, 1936, Reinhold, New-York ; et Ueber Sterine, Gallensauren und verwandte Naturstoffe, H. LETTKE, et H. H. INHOFFEN, 1936, Ferdinand ENKE, Stuttgart.

TABLEAU VI.

NOMBRE	NOM EMPLOYÉ	NOM COMMUN, SYNONYME OU ANCIENNE NOMENCLATURE	ORIGINE DU CORPS	ACTIVITÉ
1	Cholestérol	Cholestane 3-ol, dihydrocholestérol.	Girard, Péneau, « Merck ». Girard. Girard. Windaus. Rosenheim. Rosenheim. Schönheimer. Schönheimer. Girard, Rosenheim. Rosenheim. Girard, Rosenheim « Roche ».	++
2	Cholestanol			++
3	Epi-cholestanol			0
4	1-déhydrocholestérol			++
5	Coprostérol			0
6	Epi-coprostérol			++
7	Allocholestérol			0
8	Epi-allocholestérol			++
9	Acétate de cholestérol			++
10	Palmitate de cholestérol			++
11	Ergostérol	Tétrahydroergostérol.	Rosenheim. Rosenheim. Rosenheim. Windaus. Rosenheim. Girard, Rosenheim. Rosenheim. Bengtsson, Windaus. Bengtsson. Girard, Rosenheim. Rosenheim. Rosenheim.	0
12	Acétate d'ergostérol			++
13	1-dihydroergostérol			0
14	Acétate d'1-dihydroergostérol			++
15	22-dihydroergostérol			++
16	1-ergostérol			0
17	Stigmasterol			++
18	Acétate de stigmasterol			0
19	Stigmasterol			0
20	Sitostanol [du Tallol] (3).			0
21	Sitostérol (γ)	Tétrahydrostigmasterol. Dihydrositostérol. Dihydrositostérol.	Girard, Rosenheim. Rosenheim. Rosenheim. Rosenheim. Rosenheim. Rosenheim. Rosenheim. Rosenheim. Rosenheim. Rosenheim.	++
22	γ-sitostanol			++
23	Acétate de γ-sitostérol			++
24	Sitostérol (mélange de α, β et γ)			++
25	Sitostérol des graines de Soja (mélange de β et γ)			++
26	Acétate de β-sitostérol			0
27	Cinhol			0
28	Lanostérol			++
29	Lanosténone			0
30	Cholestanol			0

après plusieurs années de recherches dues principalement à Windaus et Rosenheim et King, que l'on a pu établir la structure définitive du cholestérol (fig. 3).

Cette formule correspond à $C_{27}H_{46}O$. Il n'y a qu'une double liaison dans la molécule en position 5:6 dans l'hexagone II. L'hydroxyle secondaire se trouve en position 3, et deux groupements méthyle tertiaires sont fixés sur C_{10} et C_{13} .

Avant d'indiquer la liste des stérols utilisés dans ces expériences, nous tenons à remercier les docteurs Bengtsson, Girard, Rosenheim, Schoenheimer, Stoll et Windaus qui ont eu la grande obligeance de nous préparer et de nous envoyer les stérols, sans lesquels ces expériences auraient été impossibles.

Nous faisons remarquer que nous adoptons dans cette étude la nomenclature proposée par Rosenheim et King (1934) et adoptée par Schoenheimer et Evans, Fieser, etc., et les conventions proposées par Rosenheim et Starling (1937) relatives à la configuration stérique des stérols.

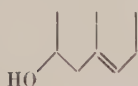
Le cholestérol, par exemple, est désigné comme *cis*, l'oxhydrile en position 3 étant arbitrairement considéré en *cis* par rapport au groupement méthyle fixé sur C_{10} . Quand, dans le cholestérol, la double liaison en 5 : 6 est supprimée par hydrogénation donnant le cholestanol (dihydrocholestérol), l'hydrogène en C_5 est considéré en position *trans* par rapport au groupement fixé sur C_{10} .

La tableau VI, p. 50, indique les corps utilisés dans ces expériences. Pour cette étude, nous avons opéré de la même façon que pour le cholestérol, c'est-à-dire que le stérol étudié est dissous dans l'alcool absolu à une concentration de 1 p. 100. Ensuite, VI gouttes de cette solution alcoolique sont ajoutées au bouillon + foie épuisé par l'alcool et l'acétone (ce qui donne une dilution du stérol de 1/10.000 environ). Au moins 4 repiquages en série, en présence du corps étudié, sont effectués avant que nous affirmions que le stérol est actif. Pour les corps donnant des résultats négatifs, nous faisons au moins 3 essais différents.

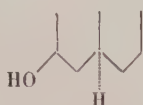
Nous exposons et discutons ici les résultats obtenus.

1° La présence de la double liaison en position 5 : 6 n'est pas indispensable à l'activité du stérol, elle peut-être suppri-

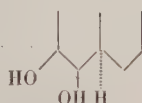
mée par hydrogénation : le cholestanol, le sitostanol, l'ergostanol et le *cis* - cholestane 3 : 4 diol sont actifs.



Cholestérol
(actif).

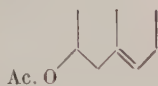


Cholestanol, ergostanol
et sitostanol
(actifs).

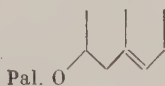


Cis-cholestane
3 : 4-diol
(actif).

2° L'estérification de la fonction alcool du cholestérol ne supprime pas l'activité : l'acétate et le palmitate de cholestérol sont actifs.



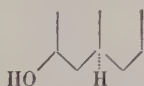
Acétate
de cholestérol
(actif).



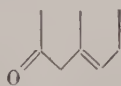
Palmitate
de cholestérol
(actif).

Cependant il faut noter que ces résultats ne sont pas applicables à tous les autres stérols actifs. L'ergostérol, par exemple, est actif, mais donne des cultures moins abondantes et à développement plus lent que le cholestérol. L'acétate de l' α -dihydroergostérol et l'acétate d'ergostérol sont inactifs.

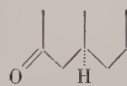
3° La transformation de la fonction alcool en cétone supprime l'activité : le $\Delta^5 : 6$ cholesténone et le cholestane 3-one (cholestanone) sont inactifs.



Cholestanol
(actif).



$\Delta^5 : 6$ cholesténone
(inactif).



Cholestane 3-one
(inactif).

4° La suppression de l'oxhydrile en position 3 suffit pour inactiver la molécule : le $\Delta^5 : 6$ cholestène et le cholestane sont inactifs.

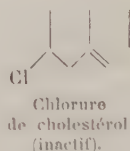
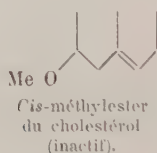


Δ^5-6 cholestène
(inactif)

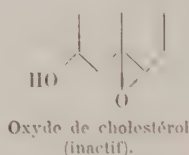
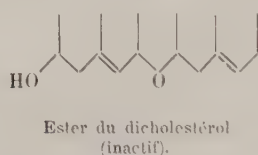


Cholestane
(inactif),

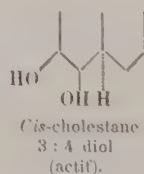
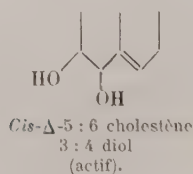
3° La présence d'un radical CH_3 ou d'un atome de chlore en position 3 inactive également la molécule. Le *cis*-méthylester du cholestérol et le chlorure de cholestérol sont inactifs.



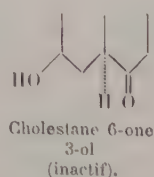
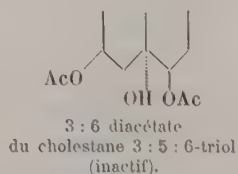
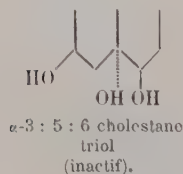
6° Sont également inactifs : L' α -oxyde de cholestérol et l'ester du dicholestérol.



7° La présence d'une fonction alcool supplémentaire en position 4 ne supprime pas l'activité : le *cis*- Δ^5 : 6 cholestène 3 : 4 diol et le *cis*-cholestane 3 : 4 diol sont actifs.

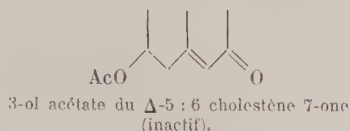


8° Par contre, la présence d'une fonction alcool ou cétone en position 6, peut inactiver la molécule : le α -3 : 5 : 6 cholestane triol, le 3 : 6 diacétate du cholestane 3 : 5 : 6 triol et le cholestane 6-one, 3-ol, sont inactifs.

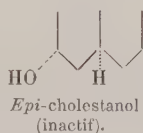
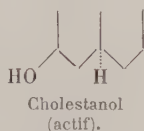


9° La présence d'une fonction cétone en position 7 inactive

également la molécule : le 3-ol acétate du $\Delta^5:6$ cholestène 7-one est inactif.

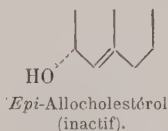
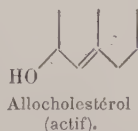
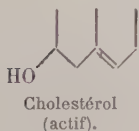


10° L'épimérisation de la fonction alcool en position 3, entraîne l'inactivation de la molécule : l'*épi*-cholestanol est inactif.

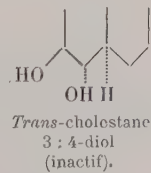
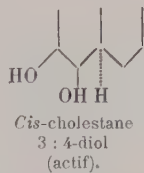
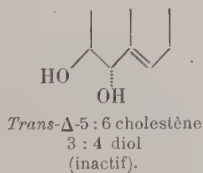
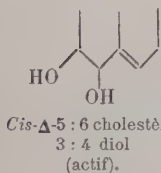


11° La transformation de la double liaison en C_5-C_6 en position C_4-C_5 n'inactive pas la molécule : l'allocholestérol est actif ainsi que le pyridino-allocholestérol (1).

11° a) L'*Epi*-allocholestérol est inactif.



12° L'épimérisation de la fonction alcool en position 4 entraîne également l'inactivation : le *trans*- $\Delta^5:6$ cholestène 3:4 diol, et le *trans*-cholestane-3:4-diol sont inactifs.

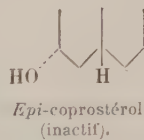
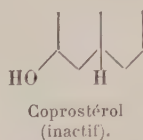
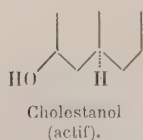


13° Si l'hydrogène fixé sur C_5 est en position *cis* par rapport

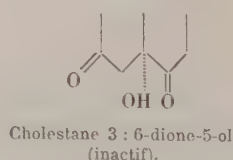
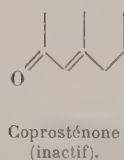
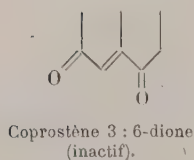
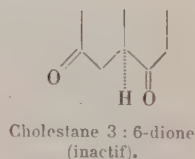
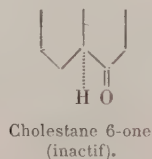
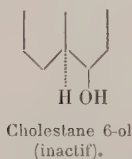
(1) Nous devons ce corps au Professeur Stoll. Le pyridino-allocholestérol doit être utilisé à faible concentration (1×10^{-6}) pour éviter l'action toxique de la pyridine.

au groupement méthyle fixé sur C_{10} , le corps perd son activité : le coprostérol est inactif.

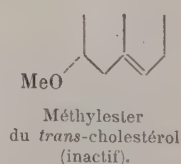
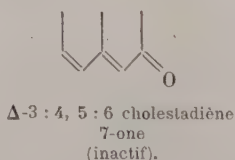
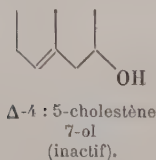
13° a) *A fortiori est inactif l'épi-coprostérol.*



14° Les corps présentant plusieurs « défauts » dans leurs molécules sont naturellement également dépourvus d'action. Nous avons vu que le cholestanone et le $\Delta^5:6$ cholesténone sont inactifs. Sont aussi inactifs : le cholestane 6-one, le cholestane 6-ol, le coprostène 3 : 6-dione, la coprosténone, le cholestane 3 : 6-dione, et le cholestane 3 : 6-dione, 5-ol.

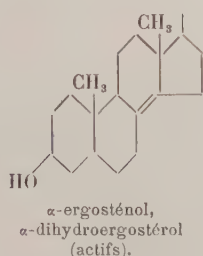
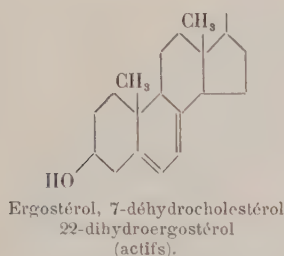


15° Sont également sans action : le $\Delta^4:5$ cholestène 7-ol, le $\Delta^3:4, 5:6$ -cholestadiène 7-one, et le méthylester du *trans*-cholestérol (le composé *cis*- est également inactif).



16° La présence d'une deuxième double liaison dans la partie

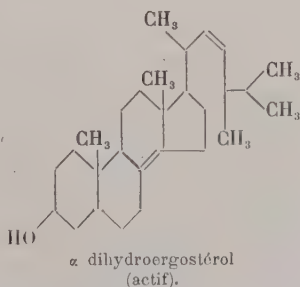
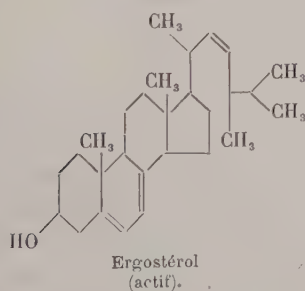
cyclique de la molécule ne lui est pas fatale : l'ergostérol, le 22-dihydroergostérol et le 7-déhydrocholestérol sont actifs.



17° De plus, la présence d'une double liaison C_8-C_{14} , dans la partie cyclique de la molécule, n'empêche pas l'activité du stérol : le α -dihydroergostérol et le α -ergostérol (tétrahydroergostérol) sont actifs.

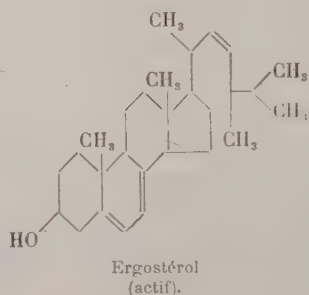
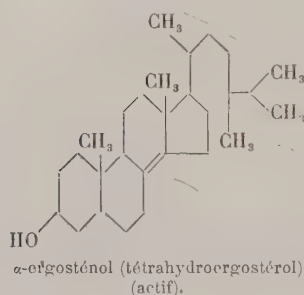
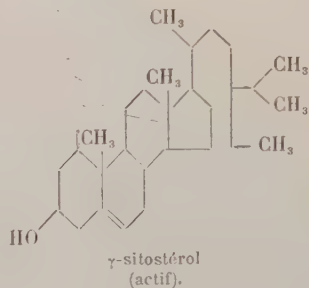
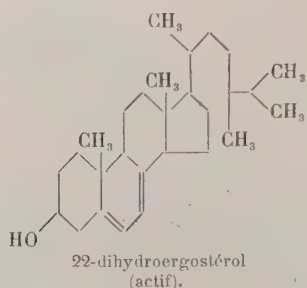
On sait que la double liaison C_8-C_{14} du tétrahydroergostérol ne peut pas être réduite *in vitro*. Elle n'est pas non plus réduite dans le tube digestif du rat, alors que le cholestérol est réduit en coprostérol. L'action positive du dihydro- et du tétrahydroergostérol pour *Trichomonas columbae* semble indiquer que les ergostérols partiellement réduits exercent leur action telle que (voir Cook 1936).

18° La présence d'une double liaison dans la chaîne latérale est également compatible avec le maintien de l'activité : l'ergostérol et l' α -dihydroergostérol sont actifs.



19° De même, l'activité est conservée lorsque les modifications de la chaîne latérale ne portent que sur la nature et l'emplacement des ramifications : l'ergostérol, le 22-dihydroergo-

stérol, l' α -ergostérol (tétrahydroergostérol), l'ergostanol (hexahydroergostérol), le γ -sitostérol, le γ -sitostanol, et le cinchol sont actifs (1).



20° Nous avons montré (§ 19) que le γ -sitostérol et le γ -sitostanol sont actifs; nous ajoutons que l'acétate de γ -sitostérol est également actif.

En plus des dérivés γ du sitostérol (les seuls dont la constitution soit connue), il existe au moins deux autres dérivés : α et β (Anderson 1926, Wallis et Fernholz 1936).

Nous avons constaté que l'acétate de β -sitostérol ne renfermant que des traces de γ est inactif (2).

Le β -sitostérol peut être séparé de l' α -sitostérol, mais pas complètement du γ . Nous avons eu à notre disposition un sitostérol (mélange de β et de γ) qui nous a permis 3 repi-

(1) Le cinchol est considéré comme isomère du sitostérol, mais la position de la double liaison est encore discutée.

(2) Nous remercions le Professeur Otto Rosenheim qui nous a suggéré les expériences relatives à l'étude du stigmastérol et sitostanol et aidée à interpréter les résultats de nos expériences.

quages seulement de *Trichomonas columbae*. Comme le γ -sitostérol est actif, nous pouvons supposer, pour expliquer ces résultats, que notre échantillon renfermait surtout du β -sitostérol et une faible quantité seulement de γ .

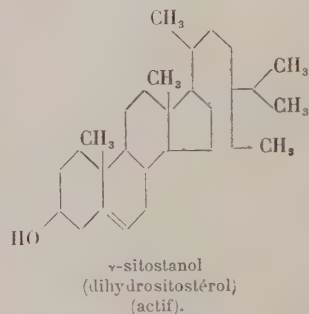
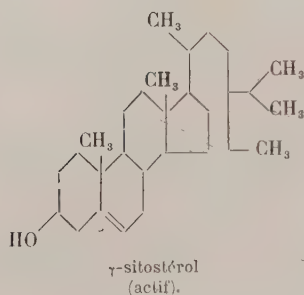
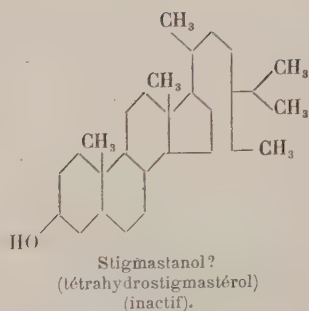
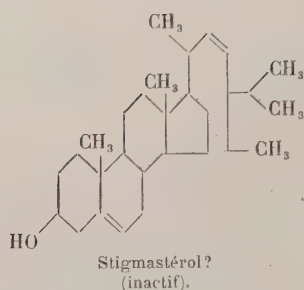
Le β -sitostérol serait donc inactif, résultat qui concorde avec les conclusions de l'étude de l'acétate de β -sitostérol, inactif.

Un échantillon de sitostanol — du Tallöl — que nous devons au professeur Bengtsson, n'a permis que 3 repiquages. C'est un mélange des isomères α et β dont les propriétés physiques correspondent à celles des échantillons les plus purs de β -sitostanol. Cet échantillon est considéré par Bengtsson (1935) comme dépourvu de γ -sitostanol. Il est donc possible que la faible activité soit due au composé α .

Nous ne pouvons cependant rien conclure quant à l'activité de l' α -sitostérol, que nous n'avons pas eu à l'état pur. L'activité d'un échantillon de sitostérol, mélange de α , β et γ , pouvant être attribuée au composé γ aussi bien qu'au composé α (1).

21° Le stigmastérol et son acétate sont sans action; phénomène qui ne s'explique ni par la constitution de leur noyau cyclique, ni par celle de la chaîne latérale telle qu'elle apparaît dans la formule actuellement admise. Mais Linsert (1936) a observé que le 7-déhydrostigmastérol irradié possède une action antirachitique très faible alors que le 7-déhydrocholestérol et le 7-déhydrositostérol sont, comme l'ergostérol, transformés par irradiation en substances antirachitiques actives. Comme on sait que la double liaison $C_{22}-C_{23}$ est sans influence sur l'activité, il est très difficile de comprendre la quasi-inactivité D du 7-déhydrostigmastérol irradié, à moins de supposer que la formule admise est inexacte. L'étude du comportement de *Trichomonas columbae* semble renforcer cette hypothèse.

(1) Nous indiquons ici que le composé α est considéré comme un isomère du stigmastérol (WALLIS et FERNHOLZ, 1936).



22° Le stigmastanol de Bengtsson (1), comme celui de Windaus, nous a permis 3 repiquages seulement. Bengtsson (1935) considère que le stigmastanol, c'est-à-dire le stigmastérol complètement réduit, est identique au sitostanol.

Le stigmastérol serait donc un sitostérol avec une double liaison en 22-23.

Si le stigmastérol et le stigmastanol correspondaient à la forme γ du sitostérol ou sitostanol, ils devraient être actifs. Or, le stigmastanol, comme le stigmastérol, est inactif.

Les conclusions tirées de l'étude du stigmastanol confirment donc les conclusions de l'étude du stigmastérol. Les formules actuellement admises pour ces deux corps doivent être inexactes. C'est-à-dire que le stigmastérol n'est pas un γ-sitostérol ayant une double liaison en 22-23, et que le stigmastanol n'est pas identique au γ-sitostanol.

(1) Ce stigmastanol a été préparé par hydrogénation d'un stigmastérol isolé — par précipitation sous forme de composé tétrabromé, débromé puis rebromé — à partir des stérols bruts de soja.

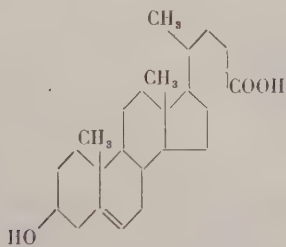
Cependant, d'après Bengtsson (1933) le β -sitostérol est identique au 22-dihydrostigmastérol. Le stigmastérol et le stigmastanol seraient donc des dérivés du β -sitostérol. Ceci explique le fait que le stigmastérol et le stigmastanol sont inactifs, comme le β -sitostérol et β -sitostanol. Nos résultats sont donc en accord avec les conclusions de Bengtsson.

Nous pouvons donc conclure des recherches exposées dans les paragraphes 20, 21, 22 :

a) Que la constitution proposée pour le stigmastérol et le stigmastanol est inexacte.

b) Que le stigmastérol et le stigmastanol sont probablement des dérivés des formes β du sitostérol dont on ignore encore la constitution.

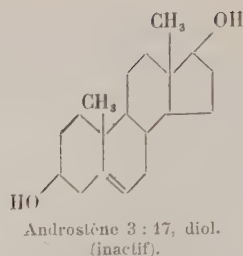
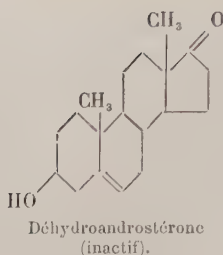
23° La dégradation de la chaîne latérale aboutissant à un acide oxycholénique dans lequel le système nucléaire du cholestérol est intact, inactive la molécule : l'acide $\Delta^5 : 6$ 3-oxycholénique est inactif.



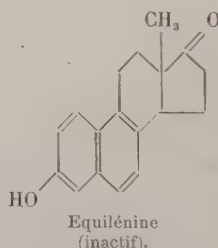
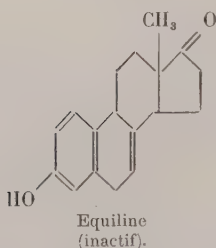
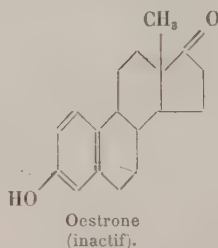
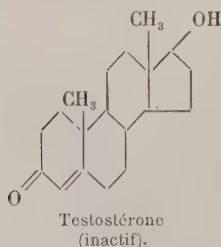
Acide $\Delta^5 : 6$, 3-oxycholénique
(inactif).

On peut prévoir que les autres acides biliaires : acide cholique, acide désoxycholique, acide lithocholique, acide chémodésoxycholique, etc..., qui présentent une chaîne latérale comme l'acide $\Delta^5 : 6$, 3-oxycholénique, et en plus, des modifications de la partie cyclique de la molécule, seront dépourvus d'activité.

24° La suppression de la chaîne latérale, entraîne également l'inactivation, qu'elle soit remplacée par un atome d'oxygène (déhydroandrostérone), ou par un oxhydrile (androstène 3 : 17-diol).



25° *A fortiori* sont inactives les substances qui, en plus de la suppression de la chaîne latérale, comportent des modifications du système nucléaire : testostérone, œstrone, équiline et équilénine.



26° Le lanostérol ($C_{30}H_{50}O$) dont on ne connaît pas encore la formule exacte, et son dérivé cétonique la lanosténone ($C_{30}H_{48}O$) sont également sans activité. Ces corps, d'origine animale, sont extraits de la lanoline. Ce ne sont d'ailleurs pas des stérols, proprement dits, mais des triterpènes pentacycliques (Dorée et Petrow 1936).

27° La vitamine D_2 (ergostérol irradié, ou calciférol) et le lumistérol sont également inactifs. On admet que dans ces composés, le radical OH fixé en position 3 est épimérisé ce qui explique leur inactivité en tant que facteur de croissance pour *Tr. columbæ*.

Remarques sur l'activité de quelques stérols.

Nous avons souvent constaté que certains stérols permettaient un développement rapide des flagellés, alors que d'autres n'autorisaient qu'un développement lent. La mesure du temps de division n'a pas été faite, mais les différences observées ont été tellement considérables (1) que nous indiquons cependant nos observations qui sont résumées dans le tableau suivant :

TABLEAU VII.

STÉROL	ACTIVITÉ	DOUBLE LIAISON dans la partie cyclique	DOUBLE LIAISON dans la chaîne latérale
Tétrahydroergostérol	++	8 : 14	
22-dihydroergostérol	++	5 : 6, 7 : 8	
Ergostérol	+	5 : 6, 7 : 8	22 : 23
α -dihydroergostérol	+	8 : 14	22 : 23
Acétate d'ergostérol	0	5, 6, 7 : 8	22 : 23
Acétate de dihydroergostérol	0	8 : 14	22 : 23
Cholestérol	++	5 : 6	
Acétate de cholestérol	++	5 : 6	

++, développement rapide, trois à quatre jours; +, développement lent, sept à huit jours; 0, pas de développement.

On voit, si l'on considère une même famille de corps, que la présence d'une double liaison dans la chaîne latérale entraîne une diminution de l'activité du stérol ; le tétrahydro- et le 22-dihydroergostérol sont plus actifs que l'ergostérol et le α -dihydroergostérol.

On voit, d'autre part, que l'estérification des stérols à activité faible comme l'ergostérol, et le α -dihydroergostérol, peut

(1) Par exemple, le développement avec un stérol peu favorable se fait en sept à huit jours, alors que le tube témoin avec un stérol très favorable, arrive au même point de développement en trois à quatre jours. Pour tous les corps que nous étudions, nous avons observé ces différences à plusieurs reprises.

entraîner la suppression de l'activité : l'acétate d'ergostérol et l'acétate de l' α -dihydroergostérol sont inactifs.

Nous avons constaté, d'autre part (voir paragraphe 2, page 53), que l'estérification du cholestérol ne supprime pas son activité. On peut se demander, dans ces conditions, si ce n'est pas la présence simultanée d'une double liaison dans la chaîne latérale et d'un radical acétique en position 3 qui est responsable de l'inactivation.

Nous devons nous contenter de poser cette question, les documents en notre possession étant insuffisants pour nous permettre de répondre d'une façon définitive.

Les conditions d'action des stérols.

Nous pouvons tirer de l'étude qui précède un certain nombre de conclusions sur l'activité des stérols en relation avec leur constitution et leur composition.

1° Seules les formes *cis* (position 3 et 4) sont actives, à l'exclusion des formes *trans* (position 3 et 4).

2° L'estérification du stérol (en position 3) est compatible avec le maintien de l'activité, mais le groupement OH dans cette position 3 ne peut être ni supprimé, ni remplacé par un groupement cétone ou un atome de chlore.

3° La présence d'un oxyhydrile supplémentaire en position 6 inactive la molécule, alors que ce même groupement en position 4 ne nuit pas à l'activité.

4° La présence d'une double liaison C_4-C_5 , C_7-C_8 ou C_8-C_{14} dans la partie cyclique de la molécule est compatible avec le maintien de l'activité.

5° La présence d'une double liaison ou de ramifications supplémentaires dans la chaîne latérale ne supprime pas l'activité.

6° La suppression des doubles liaisons de la chaîne latérale ou de la partie cyclique, par hydrogénation, est compatible avec le maintien de l'activité.

7° Le raccourcissement de la chaîne latérale ou sa suppression, entraîne l'inactivation du stérol.

REMARQUES SUR LA PHYSIOLOGIE DES TÉTRAMITIDÉS

Comparaison des Tétramitidés étudiés.

Les trois Tétramitidés que nous avons étudiés présentent une individualité biologique incontestable. L'étude des conditions de leur culture a montré qu'ils présentent également des différences dans leurs besoins trophiques. La composition des milieux de culture favorables a été faite dans les chapitres précédents. Nous comparons ici brièvement les trois espèces au point de vue : a) des sérums favorables, b) des fermentations glucidiques, c) des conditions thermiques compatibles avec leur multiplication.

a) Le tableau ci-contre montre l'action de divers sérums envisagés comme facteurs de croissance pour les Tétramitidés.

TABLEAU VIII. — Multiplication des Tétramitidés en bouillon peptoné additionné de divers sérums.

SÉRUM	<i>Tr. columbæ</i>	<i>Tr. fœtus</i> (de Glaser)	<i>Tr. fœtus</i> (de Riedmüller)	<i>Eutr. colubrorum</i>
Homme	0	±	++	±
Chat	0	0	++	±
Cheval	0	0	±	++
Mouton.	0	0	0	±
Lapin	0	0	±	0
Cobaye.	±	0	++	++
Rat.	±	0	0	±
Pigeon	++	0	0	0
Poule	0	0	0	0

0, pas de multiplication; ±, multiplication irrégulière avec le sérum de certains individus; ++, multiplication abondante avec le sérum de tous les individus.

b) Les fermentations des glucides sont résumées dans le tableau ci-joint :

TABLEAU IX. — Fermentation des glucides.

GLUCIDE	<i>Eutr. colubrorum</i>	<i>Tr. fœtus</i>	<i>Tr. columbæ</i>
Arabinose	—	—	—
Xylose	—	—	—
Rhamnose	—	—	—
Glucose	A	A	A
Galactose	A	A	A
Lactose	a	A	a
Lévuiose	A	A	a
Maltose	A	A	A
Saccharose	A	A	A
Raffinose	A	A	—
Inuline	—	a	a
Dextrine	—	A	A
Amidon soluble	—	A	A
Glycérine	—	—	—
Erythrite	—	—	—
Sorbite	—	—	—
Dulcite	—	—	—
Mannite	—	—	—

A, forte acidification; a, légère acidification; —, pas d'acidification.

c) Enfin, l'étude comparative des températures auxquelles peuvent se multiplier les flagellés, montre que l'*Eutr. colubrorum*, parasite d'un vertébré à sang froid se multiplie, comme Chatton l'avait montré, jusqu'à une température de 42°, alors qu'au contraire la limite inférieure est voisine de 28° pour *Tr. fœtus* et de 32° pour *Tr. columbæ*.

TABLEAU X.

TÉTRAMITIDÉ	12-16° C	22° C	28°	32°	36°	40°	44°
<i>Eutr. colubrorum</i> . .	+(1)	+(1)	+(2)	+(2)	+(1)(2)	0(2)	0(2)
<i>Tr. fœtus</i>	0(2)(3)	0(2)(3)	±(2)	+(2)	+(2)(3)	±(2)	0(2)
<i>Tr. columbæ</i>	0(2)(4)	0(2)(4)	0(2)	+(2)	+(2)(4)	+(2)	0(2)

(1) E. CHATTON (1918).
 (2) R. CAILLEAU (1934).
 (3) J. WITTE (1933 a).
 (4) A. BOS (1933).
 +, multiplication régulière et abondante; ±, multiplication irrégulière; 0, pas de repiquage possible.

Pour ce qui concerne les limites supérieures, on constate qu'elle est plus basse pour *Eutr. colubrorum* que pour *Tr. fœtus* et plus basse pour *Tr. fœtus* que pour *Tr. columbæ*.

Sans vouloir le moins du monde tirer de ces constatations une conclusion finaliste, nous devons cependant remarquer qu'il y a une certaine relation entre les exigences thermiques des diverses espèces de Tétramitidés et la température de leurs hôtes.

Facteurs de croissance et spécificité parasitaire.

On peut être tenté d'établir une relation entre le fait que le sérum d'une espèce animale donnée renferme ou non les facteurs de croissance pour un *Trichomonas* et la réceptivité de cette espèce animale vis-à-vis de ce *Trichomonas*.

TABLEAU XI.

<i>Trichomonas</i>	ESÈCE ANIMALE	VOIE D'INOCULATION	AUTEUR	ACTION pathogène	ACTION du sérum sur la multiplication
<i>Tr. fœtus</i> . . .	Lapin.	Vaginale.	Witte (1933 <i>a</i> , 1934).	±	±
<i>Tr. fœtus</i> . . .	Lapin.	Intraveineuse.	Lwoff et Nicolau.	0	±
<i>Tr. fœtus</i> . . .	Lapin.	Intrapéritonéale.	Lwoff et Nicolau.	0	±
<i>Tr. fœtus</i> . . .	Lapin.	Sous-dure-mérienne.	Lwoff et Nicolau.	++	±
<i>Tr. fœtus</i> . . .	Cobaye.	Intramusculaire.	Witte (1933 <i>a</i> , 1934).	++	++
<i>Tr. fœtus</i> . . .	Cobaye.	Intrapéritonéale.	Witte (1933 <i>a</i> , 1934).	++	++
<i>Tr. fœtus</i> . . .	Cobaye.	Orale.	Witte (1933 <i>a</i> , 1934).	++	++
<i>Tr. fœtus</i> . . .	Cobaye.	Sous-dure-mérienne.	Lwoff et Nicolau.	++	++
<i>Tr. fœtus</i> . . .	Rat.	Intrapéritonéale.	Lwoff et Nicolau.	±	0
<i>Tr. fœtus</i> . . .	Rat.	Intracérébrale.	Lwoff et Nicolau.	±	0
<i>Tr. fœtus</i> . . .	Mouton.	Vaginale.	Andrews et Rees.	±	0
<i>Tr. fœtus</i> . . .	Poule.	Sous-dure-mérienne.	Lwoff et Nicolau.	±	0
<i>Tr. fœtus</i> . . .	Chien.	Sous-dure-mérienne.	Lwoff et Nicolau.	++	Pas étudiée.
<i>Tr. fœtus</i> . . .	Macaque.	Sous-dure-mérienne.	Lwoff et Nicolau.	++	Pas étudiée.
<i>Tr. columbæ</i> . .	Pigeon.	Orale.	Bos (1934, <i>a</i> , <i>b</i>).	++	++
<i>Tr. columbæ</i> . .	Pigeon.	Rectale.	Waller.	++	++
<i>Tr. columbæ</i> . .	Pigeon.	Orale.	Cauthens (1934, 1936).	++	++
<i>Tr. columbæ</i> . .	Poule.	Rectale, intra-osseuse.	Waller.	0	0
<i>Tr. columbæ</i> . .	Poule.	Orale.	Cauthens (1936).	0	0
<i>Tr. columbæ</i> . .	Souris.	Intrapéritonéale.	Bos (1934 <i>a</i> , <i>b</i>).	++	Pas étudiée.
<i>Tr. columbæ</i> . .	Souris.	Sous-entamée, intrahépatique.	Bos.	++	Pas étudiée.
<i>Tr. columbæ</i> . .	Dindon.	Orale.	Bos.	++	Pas étudiée.

En d'autres termes, un animal réceptif fournit-il toujours un sérum favorable ?

Nous possédons sur ce sujet un certain nombre de documents qui sont résumés dans le tableau XI (p. 67).

On voit tout d'abord que les résultats des essais d'infection diffèrent pour un même animal suivant la voie d'inoculation. Par exemple, dans les expériences de Lwoff et Nicolau sur le lapin, les injections intraveineuses et intrapéritonéales n'ont pas conféré l'infection, alors que les injections sous-cutané-mériennes sont toujours positives et souvent mortelles.

Le sérum de lapin, considéré comme source de facteur de croissance, donne des résultats irréguliers. Il est donc très difficile de tirer, pour le moment, une conclusion de cet essai de rapprochement. Nous avons tenu cependant à poser le problème et à exposer les documents que nous possédons actuellement sur cette question.

Le cholestérol considéré comme facteur de croissance.

Nos expériences sur le *Tr. columbæ* ont montré que ce flagellé avait besoin qu'on lui fournisse du cholestérol pour effectuer sa multiplication (Cailleau 1935-1936). Nous pouvons donc conclure que *Trichomonas columbæ* est incapable de réaliser la synthèse du cholestérol. *Tr. columbæ* est le premier exemple d'un microorganisme pour lequel le cholestérol est un facteur de croissance. Jusqu'à quel point cette particularité est-elle propre à *Tr. columbæ* ?

Nous devons remarquer que, dans les milieux de culture pour *Tr. foetus* et *Eutr. colubrorum*, on ajoute des organes, du sang ou du sérum, c'est-à-dire des substances contenant du cholestérol. Il est donc possible que ces organismes soient incapables de réaliser la synthèse du cholestérol. Mais nous n'avons pas pu pousser assez loin l'analyse de la nutrition de ces deux Trichomonades pour résoudre ce problème.

Ce qui est certain, en tout cas, c'est que tous les Protozoaires libres et parasites étudiés jusqu'ici se multiplient sans qu'il soit nécessaire d'ajouter du cholestérol au milieu de

culture. C'est ainsi que *Glaucoma piriformis* (A. Lwoff 1923) *Strigomonas oncopelti* (M. Lwoff 1933), *Acanthamoeba castellanii* (Cailleau 1934), *Mayorella palestinensis* (Reich 1934), se multiplient en eau peptonée. D'autres Trypanosomides : *Strigomonas culicidarum*, *Str. fasciculata*, *Leptomonas ctenocephali* (M. Lwoff 1933) se développent en eau peptonée + hémine.

On peut donc affirmer que ces organismes n'ont pas besoin de cholestérol comme facteur de croissance. Mais on peut se demander si ces Protozoaires en réalisent la synthèse ; en effet, il semble pouvoir exister des organismes vivants qui ne renferment pas de stérols.

Les stérols chez les Bactéries.

Dès 1920, Goris avait constaté l'absence de stérols chez *Mycobacterium tuberculosis*.

Cette conclusion a été confirmée par les travaux de R. J. Anderson et ses collaborateurs (1929, 1932), Prickett et Mas-sengale (1931) et par Chargaff (1933).

Cependant, en 1935, Hecht annonçait avoir trouvé des stérols chez le bacille de Koch, résultat qui fut réfuté par Anderson, Schoenheimer, Crowder et Stodola (1935). On peut donc considérer actuellement l'absence de stérol chez le bacille tuberculeux comme hautement probable.

Comme *Tr. columbæ* constitue un réactif très sensible de certains stérols, nous avons essayé d'obtenir sa culture en bouillon + foie épuisé par l'acétone, additionné d'un extrait de bacille de Koch.

Cet extrait nous a été obligeamment donné par M. Fetke. Il s'agissait d'un extrait acétonique que nous avons évaporé dans le vide et repris par l'alcool (1). L'addition de cet extrait alcoolique n'a pas permis la culture de *Tr. columbæ*, quelle que soit la dose employée. Cette expérience confirme donc

(1) 1 c. c. de solution alcoolique correspond à 4 grammes environ de bacilles de Koch secs.

les conclusions relatives à l'absence de stérols chez *Mycobacterium tuberculosis*.

Escherichia coli, d'après von Behring (1930), est également dépourvu de stérol. Il en est de même de *Corynebacterium diphtheriae* (von Behring 1930, Chargaff 1933). Pour ce qui concerne *E. coli*, nous avons constaté que l'extrait de corps bactériens, obtenu à chaud par l'acétone et repris dans l'alcool, donne des résultats négatifs comme l'extrait de *Mycobacterium tuberculosis*.

Cependant il semble bien que cette absence de stérol ne soit pas générale chez les Bactéries. *Azotobacter chroococcum* (Greaves 1935, Sifferd et Anderson 1936) renferme un ou des stérols.

Les stérols ne sont donc pas des constituants universels de la substance vivante. Leur présence a cependant été signalée chez tous les animaux et chez tous les végétaux supérieurs qui ont été étudiés à ce point de vue. On a également trouvé des stérols chez les Levures et les Moisissures. Pour ce qui concerne les Protozoaires, on ne possède malheureusement aucune donnée relative à la présence ou à l'absence de stérols.

Les stérols, facteurs de croissance pour les Insectes.

Trichomonas columbæ n'est cependant pas le seul exemple d'un organisme ayant besoin d'un stérol comme facteur de croissance. En effet, Hobson (1935) en même temps que nous démontrions le rôle du cholestérol pour *Trich. columbæ*, a montré que la larve du diptère : *Lucilia sericata* (élevage aseptique) ne se développe que si on lui fournit un stérol : cholestérol, ergostérol, sitostérol ou lanostérol (1).

Il est possible que d'autres Insectes aient également besoin

(1) Nous faisons des réserves pour ce qui concerne l'activité du lanostérol. Ainsi que nous l'a écrit le Professeur O. Rosenheim, il est très difficile d'obtenir du lanostérol pur, et le lanostérol contient souvent du cholestérol. Le lanostérol n'est d'ailleurs pas un stérol proprement dit, mais un triterpène pentacyclique.

de stérols. C'est ainsi que Lafon (1937) a constitué un milieu de culture pour les larves de *Drosophila melanogaster* (Meig), lequel ne permet le développement qu'en présence de lécithine. Il est possible que la lécithine agisse comme source de cholestérol (v. p. 46).

Rôle physiologique des stérols considérés comme facteurs de croissance.

Les stérols présentent une grande importance biologique. L'examen du tableau ci-joint, emprunté à Needham et que

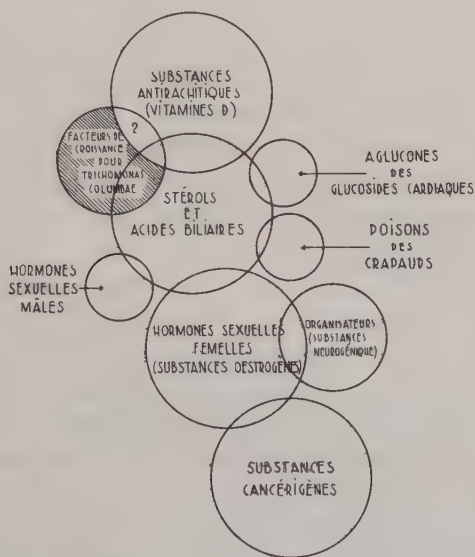


FIG. 4. — Schéma de Needham montrant l'activité biologique des stérols, complété pour ce qui concerne les facteurs de croissance pour *Trichomonas columbæ*. Le problème des rapports de ces facteurs avec les vitamines D est actuellement résolu : les vitamines D ne peuvent pas servir de facteur de croissance (voir p. 62).

nous avons complété pour ce qui concerne les facteurs de croissance pour *Tr. columbæ* montre bien les aspects variés de leur action. Nous passerons brièvement en revue le rôle physiologique des stérols.

Il existe des stérols d'origine végétale qui possèdent une action sur le cœur : strophanthine, ouabaïne, digitoxine, cymarine, etc..., certains autres possèdent une action toxique, comme quelques poisons des crapauds : bufotoxine, bufotaline, bufogine, etc... Nous ne nous en occuperons pas ici.

Les stérols qui retiendront notre attention sont ceux qui interviennent dans le développement et la croissance des organismes. Ce sont les substances anti-rachitiques, les hormones sexuelles, les corps cancérigènes, les « organisateurs », et enfin le cholestérol.

Les hormones sexuelles agissent en déterminant les caractères sexuels secondaires. Elles interviennent d'autre part, comme l'ont montré Lacassagne (1932) et Loeb (1933) dans l'étiologie de certains cancers. L'œstrone d'ailleurs n'agit pas directement et ne manifeste son action que sous l'influence de certains facteurs héréditaires.

Au contraire, les corps cancérigènes, d'après les travaux de Kennaway, Cook et de leurs collaborateurs (1931, 1932 *a, b*, 1934) au Research Institute of the Cancer Hospital, Londres, semblent pouvoir agir directement. Ce sont, entre autres, le 1 : 2 benzopyrène, le méthylcholanthrène, et le 1 : 2,3 : 6-dibenzoanthracène. Il faut noter que certains d'entre eux possèdent également une action œstrogénique.

Enfin Waddington, Needham, Nowinski et Lemberg (1934-1935), ont pu montrer que certains de ces corps cancérigènes : le 1 : 9-diméthylphénanthrène, le 9 : 10-dihydroxy 9 : 10 di-*n*-butyl-1 : 2 3 : 6-dibenzanthracène, et le 1 : 3 : 6-dibenzanthracène, pouvaient agir comme « évocateurs », c'est-à-dire qu'ils sont capables d'induire la différenciation de l'ectoderme de la gastrula des amphibiens en tissu nerveux.

Tous ces corps agissent donc sur la différenciation cellulaire, et jouent un rôle important au cours du développement normal, ou dans le déterminisme de certains processus pathologiques.

D'autres stérols, comme les vitamines D, interviennent directement dans les phénomènes de croissance proprement dits, en agissant sur le métabolisme du calcium.

Le mécanisme exact de cette action n'est pas élucidé. On sait seulement qu'en présence de vitamine D, l'absorption du Ca par l'intestin est augmentée (Nicolaysen 1937) ainsi que la teneur du sérum en calcium (Crimm et Strayer 1933).

D'autre part, l'excrétion du calcium endogène est augmentée chez les animaux carencés en vitamine D et l'activité des phosphatases est également augmentée (Folley et Kay 1937).

Quant au cholestérol, qui est un constituant général des Mé-tazoaires, son rôle physiologique est absolument inconnu et son origine même est discutée. Les animaux supérieurs en réalisent la synthèse, mais on ignore tout des matériaux à partir desquels cette synthèse est effectuée, et, à plus forte raison, de son mécanisme.

Quant aux végétaux (certaines Bactéries mises à part, v. p. 69), ils réalisent eux-mêmes entièrement la synthèse de leur stérols : sitostérol, stigmastérol, fucostérol, ergostérol, etc...

Chez les végétaux qui effectuent la synthèse des stérols, certaines hormones sexuelles peuvent exercer une action stimulante, c'est-à-dire augmenter la vitesse de développement. C'est ce qu'on observe chez certaines Levures (Weber 1937) et chez les végétaux supérieurs (Scharer et Schropp, 1937).

On ignore actuellement tout du mode d'action des hormones sexuelles sur les végétaux, qui, dans les cas cités, ne sont pas des facteurs de croissance ou des vitamines, mais de simples stimulants.

L'action du cholestérol pour *Trichomonas columbæ* aussi bien que pour *Lucilia sericata* (Hobson 1935) est au contraire celle d'un facteur de croissance (1). La question de son rôle physiologique reste entièrement ouverte.

(1) Un facteur de croissance pour un organisme donné (d'après la définition de A. Lwoff) est une substance dont cet organisme est incapable de réaliser la synthèse, et en l'absence de laquelle toute multiplication est impossible.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS (1)

1° *Eutrichomastix colubrorum* qui n'avait pu être cultivé jusqu'ici que dans des milieux contenant des particules (Chatton 1918), bouillon + foie, bouillon + sang, est capable de se développer dans des milieux liquides (bouillon + sérum).

2° Les sérums de diverses espèces animales ne sont pas également favorables. Les sérums de cheval et de cobaye donnent de bons résultats à l'exclusion des sérums d'homme, de chat, de mouton et de rat, qui donnent des résultats irréguliers, et des sérums de lapin, de pigeon et de poule qui donnent des résultats négatifs.

3° *Eutrichomastix colubrorum* attaque un certain nombre de glucides et polyalcools: glucose, galactose, lévulose, maltose, saccharose et raffinose: forte acidification; lactose: légère acidification; arabinose, xylose, rhamnose, inuline, dextrine, glycérine, érythrite, sorbite, dulcité et mannite: pas d'acidification.

4° *Trichomonas foetus* peut se multiplier en bouillon + sérum de cheval (Witte 1933, Riedmüller 1936). Nous n'avons pas pu confirmer ces résultats, mais nous avons vu par contre, que les sérums d'homme, de chat et de cobaye sont favorables, alors que les sérums de lapin et de cheval donnent des résultats irréguliers; les sérums de mouton, rat, pigeon et poule, des résultats négatifs.

5° Ces résultats sont valables pour les souches européennes

(1) Toutes les conclusions qui ne sont pas suivies du nom d'un auteur sont originales.

de Witte et de Riedmüller. La souche américaine de Glaser est incapable de se développer en bouillon + sérum.

6° *Trichomonas fetus* (souches de Witte et de Glaser) attaque un certain nombre de glucides et polyalcools: glucose, galactose, lactose, lévulose, maltose, saccharose, dextrine et amidon soluble: forte acidification; inuline: légère acidification; arabinose, xylose, rhamnose, glycérine, érythrite, sorbite, dulcité et mannite: pas d'acidification. La souche de Riedmüller se comporte de façon identique (Riedmüller 1936).

7° *Trichomonas columbæ* qui n'avait été cultivé qu'en bouillon foie (A. Bos 1933) est capable de se développer en bouillon sérum.

8° Seuls les sérums de pigeon et de rat sont favorables, à l'exclusion des sérums de : homme, chat, cheval, mouton, lapin, cobaye et poule.

9° L'action négative de certains sérums (ex. sérum de cheval) a été analysée; elle tient: 1) à une action agglutinante, 2) à l'absence d'un facteur de croissance.

10° *Trichomonas columbæ* fait fermenter un certain nombre de glucides et polyalcools: glucose, galactose, maltose, saccharose, dextrine et amidon soluble: forte acidification; lactose, lévulose et inuline : légère acidification; arabinose, xylose, rhamnose, raffinose, glycérine, érythrite, sorbite, dulcité et mannite: pas d'acidification.

11° Le foie apporte aux flagellés au moins deux facteurs de croissance. L'un de ces facteurs est insoluble dans l'acétone, l'alcool et l'éther; il est thermostable. Sa nature n'a pas été déterminée.

12° L'autre facteur, soluble dans l'acétone et l'alcool, a été identifié au cholestérol.

13° L'étude de l'activité de 67 stérols en tant que facteur de croissance pour *Trichomonas columbæ* a été faite. Les résultats sont les suivants:

A) La présence de la double liaison en position 5-6 n'est pas nécessaire et l'estérification de la fonction alcool en position 3 (par l'acide acétique ou palmitique) ne supprime pas l'activité.

B) La transformation de la fonction alcool (en position 3) en

cétone, ou sa suppression inactive la molécule, ainsi que le remplacement du radical OH par un atome de chlore.

C) La présence d'une fonction alcool supplémentaire en position 4 ne nuit pas à l'activité.

D) Par contre, la présence d'une fonction alcool ou cétone en position 6, ou d'une fonction cétone en position 7 inactive la molécule.

E) L'épimérisation de l'oxhydrile en position 3 ou position 4, ou de l'hydrogène en position 5, inactive la molécule.

F) Les corps présentant plusieurs « défauts » dans leur molécule sont *a fortiori* inactifs.

G) La présence d'une deuxième double liaison en 7-8 ou en 4-5, n'est pas fatale, non plus que la présence d'une double liaison en 8-14.

H) La présence d'une double liaison dans la chaîne latérale ne supprime pas l'activité, de même que les modifications de la chaîne latérale ne portant que sur la nature et l'emplacement des ramifications.

I) Par contre, la dégradation de la chaîne latérale, aboutissant aux acides biliaires, ou sa suppression, aboutissant aux hormones sexuelles, inactive complètement le stérol.

J) L'étude de plusieurs échantillons de β et de γ -sitostérol et sitostanol, du stigmastérol et du stigmastanol, nous a montré que le stigmastanol et le stigmastérol (conformément aux conclusions de Bengtsson 1935) doivent être considérées comme des dérivés de la forme β du sitostérol qui ne possède pas d'activité pour *Trichomonas columbæ*.

K) L'étude de plusieurs dérivés d'ergostérol a montré que la double liaison en 22-23, diminue l'activité du stérol, et que l'estérification d'une molécule contenant cette double liaison suffisait pour supprimer son action. L'estérification d'un stérol sans double liaison dans la chaîne latérale, ne supprime pas son activité.

L) Le flagellé *Trichomonas columbæ* et la larve du diptère *Lucilia sericata* (Hobson 1935) sont les seuls organismes pour lesquels le cholestérol a été décrit comme facteur de croissance.

M) La comparaison des trois Tétramitidés étudiés, au point de vue 1) nutrition, 2) fermentation des glucides, 3) exigences thermiques, montre que chacun d'eux présente un ensemble de caractères physiologiques propres.

TRAVAUX CITÉS

1932. ABELEIN (R.). *Munch. Tierärztl. Wschr.*, p. 235.
1926. ANDERSON (R. J.) et SHRINER. *Journ. Biol. Chem.*, **71**, p. 389.
1929. ANDERSON (R. J.) et CHARGAFF (E.). *Journ. Biol. Chem.* **84**, p. 103.
1932. ANDERSON. (Voir PANGBORN, CHARGAFF et ANDERSON.)
1935. ANDERSON (R. J.), SCHOENHEIMER (R.), CROWDER (J. A.) et STODOLA (F. H.). *Zeit. Physiol. Chem.*, **237**, p. 40.
1936. ANDREWS (J.) et REES (C. W.). *Journ. of Parasit.*, **22**, p. 108.
1930. BEHRING v. (N.). *Zeit. Physiol. Chem.*, **192**, p. 112.
1935. BENGTSSON (B. E.). *Zeit. Physiol. Chem.*, **237**, p. 45.
1935. BISHOP (A.). *Parasit.*, **27**, p. 246.
1936. BISHOP (A.). *Parasit.*, **28**, p. 443.
1932. BOS (A.). *Zentral. f. Bakt. Parasit. u. Infekt. Orig.*, **126**, p. 550.
1933. BOS (A.). *Zentral. f. Bakt. Parasit. u. Infekt. Orig.*, **130**, p. 221.
- 1934 a. BOS (A.). *Tjdschr. v. Diergeneeskunde*, **61**, p. 1125.
- 1934 b. BOS (A.). *Zentral. f. Bakt. Parasit. u. Infekt. Orig.*, **132**, p. 453.
1931. BURT (M. L.) et ANDERSON (R. J.). *Journ. Biol. Chem.*, **98**, p. 43.
1934. BUTENANDT et TSCHERNING. *Zeit. Physiol. Chem.*, **229**, p. 185.
- 1933 a. CAILLEAU (R.). *C. R. Soc. Biol.*, **114**, p. 474.
- 1933 b. CAILLEAU (R.). *C. R. Soc. Biol.*, **116**, p. 721.
1934. CAILLEAU (R.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, **27**, p. 943.
1935. CAILLEAU (R.). *C. R. Soc. Biol.*, **119**, p. 853.
- 1936 a. CAILLEAU (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **121**, p. 108 et 424.
- 1936 b. CAILLEAU (R.). *C. R. Soc. Biol.*, **122**, p. 1027.
- 1936 c. CAILLEAU (R.). Report Second International Congress for Microbiology. Londres, juillet 1936.
- 1937 a. CAILLEAU (R.). *C. R. Soc. Biol.*, **124**, p. 435.
- 1937 b. CAILLEAU (R.). *C. R. Soc. Biol.*, **124**, p. 1042.
1934. CAUTHENS (G.). *Proc. Helm. Soc. Washington*, **1**, 22.
1935. CAUTHENS (G.) et HARRIS (M. M.). *Amer. Journ. Hyg.*, **22**, p. 346.
1936. CAUTHENS (G.). *Amer. Journ. Hyg.*, **23**, p. 132.
1933. CHARGAFF (E.). *Zeit. Physiol. Chem.*, **217**, p. 215 ; **218**, p. 223.
1918. CHATTON (E.). *C. R. Soc Biol.*, **81**, p. 343, 714, 774.
- 1932 a. COOK (J. W.), HEWITT (C.) et HEIGER (I.). *Nature*, **30**, p. 926.
- 1932 b. COOK (J. W.), HEIGER (I.), KENNAWAY (E. L.) et MAYNEORD (W. V.). *Proc. Roy. Soc., B*, **111**, p. 455.
1934. COOK (J. W.) et HASLEWOOD. *Journ. Chem. Soc.*, p. 428.

1936. COOK (J. W.). *Chem. Soc. Ann. Reports*, p. 348.
1936. CRIMM et STRAYER. *Journ. Biol. Chem.*, **112**, p. 511.
1934. DAUST (E.). *Tierärztl. Rundschau*, **28**, **29**, **30**, **31**.
1936. DORÉE (C.) et PETROW (V. A.). *Journ. Chem. Soc.*, p. 1562.
1935. ELLIOTT (A. M.). *Archiv. f. Protist.*, **84**, p. 156.
1936. FIESER (L. F.). *The Chemistry of natural Products Related to Phe-nanthrene*. Reinhold, New York.
1937. FOLLEY (S. J.) et KAY (H. D.). *Ergebn. der Enzymforsch.*, **5**, p. 159.
1935. FUTAMURA (H.). *Journ. Jap. Soc. Vet. Sci.*, **14**, p. 392.
1931. GERARD et HYMAN. *Amer. Journ. of Physiol.*, **97**, p. 524.
1933. GIRARD (A.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **15**, p. 562.
1930. GLASER (R.) et CORIA (N. A.). *Journ. Exp. Med.*, **51**, p. 787.
1935. GLASER (R.) et CORIA (N. A.). *Amer. Journ. Hyg.*, **22**, p. 221.
1920. GORIS (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, **34**, p. 497.
1935. GREAVES (J.). *Journ. Bactér.*, **30**, p. 143.
1935. HALL (R. P.) et ELLIOTT (A. M.). *Archiv. f. Protist.*, **85**, p. 443.
1935. HECHT (E.). *Zeit. Physiol. Chem.*, **231**, p. 29 et 279.
1933. HEILBRON (M. I.), SIMPSON (J. C. E.) et SPRING (F. S.). *Journ. Chem. Soc.* p. 626.
1933. HETHERINGTON (A.). *Archiv. f. Protist.*, **80**, p. 225.
1935. HOBSON (R.). *Biochem. Journ.*, **29**, p. 2023.
1930. KENNAWAY (E. L.) et HEIGER (I.). *Brit. Med. Journ.*, **1**, p. 1044.
1925. KOFOLD (C. A.) et WAGENER (E. H.). *Journ. Lab. and Clin. Med.*, **9**, p. 683.
1933. KUST (D.). *Deut. Tierärztl. Wschr.*, p. 785.
1932. LACASSAGNE (A.). *Compt. Rend.*, **195**, p. 630.
1937. LAPON (M.). *C. R. Soc. Biol.*, **124**, p. 798.
1936. LETTRE (H.) et INHOFFEN (H. H.). *Über Sterine, Gallensaure und verwandte Naturstoffe*. Ferdinand Enke, Stuttgart.
1936. LINSERT (O.). *Zeit. Physiol. Chem.*, **241**, p. 125.
1935. LOEB (L.). *Journ. Amer. Med. Ass.*, **104**, p. 1597.
1918. LUND. *Amer. Journ. Physiol.*, **45**, p. 351 et 365.
1932. LWOFF (A.). *Recherches biochimiques sur la nutrition des proto-zoaires. Monographie de l'Institut Pasteur*. Masson, Paris.
1933. LWOFF (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **113**, p. 231.
1934. LWOFF (A.). *Zentral. f. Bakt.*, **130**, p. 498.
1935. LWOFF (A.) et NICOLAU (S.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, **27**, p. 277 et *Ann. Inst. Pasteur*, **55**, p. 654.
1933. LWOFF (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, **51**, p. 55 et 707.
1934. LWOFF (M.). *C. R. Soc. Biol.*, **115**, p. 237.
1935. LWOFF (M.). *C. R. Soc. Biol.*, **119**, p. 969.
1936. LWOFF (M.). *C. R. Soc. Biol.*, **121**, p. 419.
1900. MAZZANTI (E.). *Giorn. dell. Re. Soc. Vet.*, p. 629.
1934. NEEDHAM (P.), WADDINGTON (C. H.) et NEEDHAM (D. M.). *Archiv. f. Exper. Zellforsch.*, **15**, p. 307.
1935. NEEDHAM (J.). *Advances in Modern Biol.*, **4**, p. 239.
1935. NICOLAU (S.) et LWOFF (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, **55**, p. 654.
1937. NICOLAYSEN (R.). *Biochem. Journ.*, **31**, p. 107 et 122.
1932. PANGBORN (M. C.), CHARGAFF (E.) et ANDERSON (R. J.). *Journ. Biol. Chem.*, **98**, p. 43.
1929. PETERS. *Journ. Physiol.*, **68**.

1932. PITTS. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **29**, p. 542.
1931. PRICKETT (R. S.) et MASSENGALE (O. N.). *Journ. Inf. Dis.*, **49**, p. 297.
1933. REICH (K.). *Archiv. f. Protist.*, **79**, p. 99.
1934. REICH (K.). *Journ. Exp. Zool.*, **69**, p. 497.
1928. RIEDMULLER (L.). *Zentral. f. Bakt., Orig.*, **108**, p. 103.
1933. RIEDMULLER (L.). *Schw. Arch. f. Tierheilk.*, **75**, p. 457.
1936 a. RIEDMULLER (L.). *Zentral. f. Bakt., Orig.*, **137**, p. 428.
1936 b. RIEDMULLER (L.) Report Second International Congress for Microbiology. Londres 1936.
1878. RIVOLTA. *Giorn. Anat. Fisiol., e. Path. Anim.*, Pisa, **10**.
1932. ROSENHEIM (O.) et KING (H.). *Chem. and Ind.*, **51**, p. 464.
1935. ROSENHEIM (O.) et KING (H.). *Chem. and Ind.*, **54**, p. 697.
1937. ROSENHEIM (O.) et STARLING (W.). *Journ. Chem. Soc.*, p. 377.
1935, 1936. RUZICKA (L.) et ses collaborateurs. *Helv. Chem. Acta*, **18**, p. 61, 186, 994, 998, 1264, **19**.
1937. SCHAAF (J.) et SCHMITT (H.). *Zentral. f. Bakt. Orig.*, **138**, p. 500.
1937. SCHARER (K.) et SCHROPP (W.). *Biochem. Zeit.*, **290**, p. 1.
1936. SCHOENHEIMER (R.) et EVANS (E.). *Journ. Biol. Chem.*, **114**, p. 571.
1936. SIFFERD (R. H.) et ANDERSON (R. S.). *Zeit. Physiol. Chem.*, **239**, p. 270.
1934. WADDINGTON (C. H.), NEEDHAM (J.), NOWINSKI (W. W.), NEEDHAM (D. M.), et LEMBERG (R.). *Nature*, **134**, p. 103.
1936. WALLIS (E. S.) et FERNHOLZ (E.). *Journ. Amer. Chem. Soc.*, **58**, p. 2446.
1934. WALLER (E. F.). *Journ. Amer. Vet. Med. Ass.*, **84**, p. 596.
1937. WEBER (A. P.). *Ann. Ferm.*, **3**, p. 81.
1933. WENRICH (D. H.) et EMMERSON (M. A.). *Journ. of. Morph.*, **55**, p. 193.
1935. WINDAUS (A.), LETTRE (H.) et SCHENCK (F.). *Ann. Chem.*, **520**, p. 98.
1933 a. WITTE (J.). *Archiv. f. Wissen. u. Prakt. Tierheilk.*, **66**, p. 333.
1933 b. WITTE (J.). *Zentral. f. Bakt., Orig.*, **128**, p. 189.
1934. WITTE (J.). *Berl. Tierärztl. Woch.*, **34**, p. 564, **42**.
-

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

LE BACTÉRIOPHAGE.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 4 juin 1937.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

A. MARETHEUX ET L. PACTAT, IMP., 1, RUE CASSETTE, PARIS
